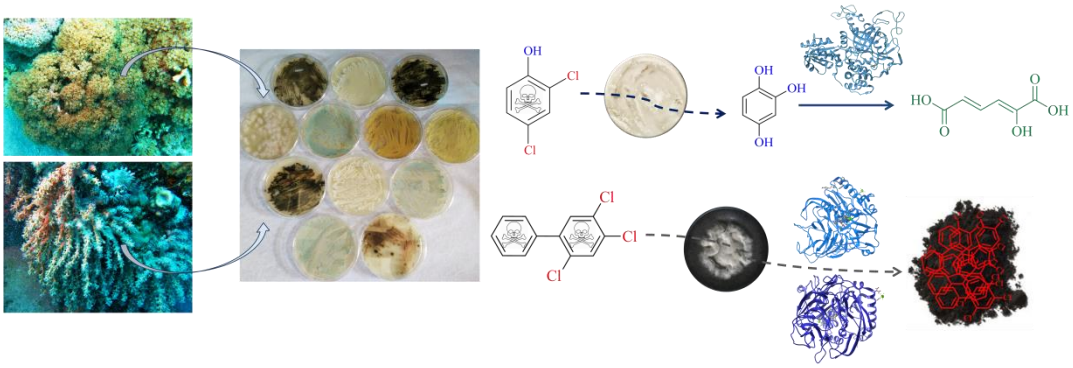
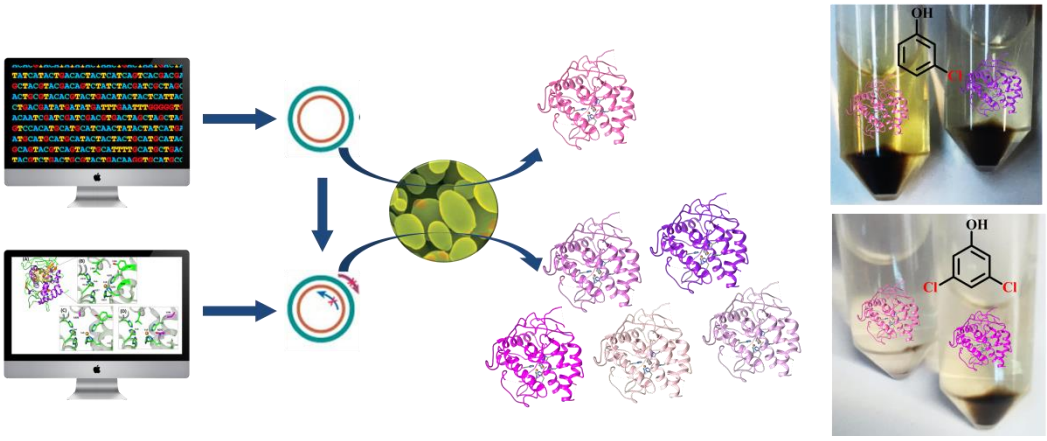
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας IV Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανακάλυψη καινοτόμων βιοκαταλυτών μυκητιακής προέλευσης και εφαρμογή τους στη βιοεξυγίανση χλωριωμένων αρωματικών ρύπων

Ευστράτιος Νικολάιβιτς
Χημικός Μηχανικός Ε.Μ.Π.





Επιβλέπων Καθηγητής: Ευάγγελος Τόπακας

Αθήνα 2019

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202).

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΕΣΠΑ 2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Στα πρότυπα δύναμης και επιμονής,
τους γονείς μου
Φωτεινή και Λουκά

“Progress is made by trial and failure;
the failures are generally a hundred times more numerous than the successes;
yet they are usually left unchronicled.”

William Ramsay

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ευάγγελος Τόπακας Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.	Επιβλέπων Καθηγητής
Νικόλαος Φωκιαλάκης Επίκουρος Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.	Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Φραγκίσκος Κολίσης Ομότιμος Καθηγητής Ε.Μ.Π.	Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Δημήτριος Κέκος Καθηγητής Ε.Μ.Π.	Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής
Αναστασία Δέτση Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.	Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής
Δημήτριος Χατζηνικολάου Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.	Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής
Μαρία Δημαρόγκωνα Επίκουρη Καθηγήτρια Π.Π.	Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

12. **Nikolaivits, E.**; Agrafiotis, A.; Termentzi, A.; Machera, K.; Le Goff, G.; Álvarez, P.; Chavanich, S.; Benayahu, Y.; Ouazzani, J.; Fokialakis, N.; Topakas, E. Unraveling the detoxification mechanism of 2,4-dichlorophenol by marine-derived mesophotic symbiotic fungi isolated from marine invertebrates. *Mar. Drugs.* **2019**, 17, 564.

11. Mandic, M.; Djokic, L.; **Nikolaivits, E.**; Prodanovic, R.; O'Connor, K.; Jeremic, S.; Topakas, E.; Nikodinovic-Runic, J. Identification and characterization of new laccase biocatalysts from *Pseudomonas* species suitable for degradation of synthetic textile dyes. *Catalysts*. **2019**, 9, 629.

10. **Nikolaivits, E.**; Kanelli, M.; Dimarogona, M.; Topakas E. A middle-aged enzyme still in its prime: Recent advances in the field of cutinases. *Catalysts.* **2018**, 8(12), 612.

9. **Nikolaivits, E.**; Dimarogona, M.; Karagiannaki I.; Chalima A.; Fishman A.; Topakas E. Characterization and protein engineering of a novel versatile fungal polyphenol oxidase with chlorophenol bioremediation potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, 84, e01628-18.

8. **Nikolaivits, E.**; Termentzi, A.; Skaltsounis, A.-L.; Fokialakis, N.; Topakas, E. Enzymatic tailoring of oleuropein from *Olea europaea* leaves and product identification by HRMS/MS spectrometry. *J. Biotechnol.* **2017**, 253, 48–54.

7. **Nikolaivits, E.**; Makris, G.; Topakas, E. Immobilization of a cutinase from *Fusarium oxysporum* and application in pineapple flavor synthesis. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65 (17), 3505–3511.

6. **Nikolaivits, E.**; Dimarogona, M.; Fokialakis, N.; Topakas, E. Marine-derived biocatalysts: Importance, accessing, and application in aromatic pollutant bioremediation. *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 265.

5. El-Gamal, R.; **Nikolaivits, E.**; Zervakis, G. I.; Abdel-Maksoud, G.; Topakas, E.; Christakopoulos, P. The use of chitosan in protecting wooden artifacts from damage by mold fungi. *Electron. J. Biotechnol.* **2016**, 24, 70–78.

4. **Nikolaivits, E.**; Kokkinou, A.; Karpusas, M.; Topakas, E. Microbial host selection and periplasmic folding in *Escherichia coli* affect the biochemical characteristics of a cutinase from *Fusarium oxysporum*. *Protein Expr. Purif.* **2016**, 127, 1–7.

3. **Nikolaivits, E.**; Norra, G.-F.; Voutsas, E.; Topakas, E. Cutinase from *Fusarium oxysporum* catalyzes the acylation of tyrosol in an aqueous medium: optimization and thermodynamic study of the reaction. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, 129, 29–36.

2. Kanelli, M.; Vasilakos, S.; **Nikolaivits, E.**; Ladas, S.; Christakopoulos, P.; Topakas, E. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) (PET) fibers by a cutinase from *Fusarium oxysporum*. *Process Biochem.* **2015**, 50 (11), 1885–1892.

1. Dimarogona, M.; **Nikolaivits, E.**; Kanelli, M.; Christakopoulos, P.; Sandgren, M.; Topakas, E. Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2015**, 1850 (11), 2308–2317.

Δημοσιεύσεις από συνέδρια με κριτές/Δημοσίευση σε μη επιστημονικό περιοδικό

4. **Nikolaivits, E.**; Agrafiotis, A.; Fokialakis, N.; Topakas, E. Biodegradation of 2, 4, 5-trichlorobiphenyl (PCB29) by marine-derived mesophotic fungi. *N. Biotechnol.* **2018**, 44, S136–S137.

3. **Nikolaivits, E.;** Topakas, E. Improved characteristics of an industrial biocatalyst expressed in engineered *E. coli*. *Atlas of Science* **2017**, February 8

2. **Nikolaivits, E**.; Termentzi, A.; Skaltsounis, A.; Fokialakis, N.; Topakas, E. Enzymatic tailoring of oleuropein isolated from *Olea europaea* leaves. *Planta Med.* **2016**, 81 (S 01), S1–S381.

1. Topakas, E.; **Nikolaivits, E.**; Kanelli, M.; Christakopoulos, P. A cutinase from *Fusarium oxysporum* with potential for PET surface modification. *N. Biotechnol.* **2014**, 31, Supple (0), S90.

Συμμετοχές σε Διεθνή συνέδρια

11. **14th BIOTRANS (Groningen, the Netherlands 2019)**
    "Structural and functional characterization of a novel fungal GH30_7 xylanase with xylobiohydrolase auxiliary activity" and
    "Discovery of novel enzymes from marine-derived mesophotic fungi able to bioconvert chlorinated aromatic pollutants"

10. **6th International Conference on Novel Enzymes (Darmstadt, Germany 2018)**
    "Discovery of a novel enzymatic activity from a marine-derived fungus: Catalase with catechol dioxygenase activity"
    "Expression and purification of a novel laccase from a marine-derived mesophotic PCB-degrading fungus"

9. **18th European Congress On Biotechnology (Geneva, Switzerland 2018)**
    "Biodegradation of 2,4,5-trichlorobiphenyl (PCB29) by marine-derived mesophotic fungi"

8. **6th International Conference on Sustainable Solid Waste Management (Naxos, Greece 2018)** -*Oral presentation*
    "Potential of marine-derived mesophotic fungi for the bioremediation of 2,4-dichlorophenol-contaminated wastewaters"

7. **13th BIOTRANS (Budapest, Hungary 2017)**
    "Discovery of marine-derived mesophotic biocatalysts for the degradation of persistent organic pollutants" and
    "Protein engineering of a fungal Polyphenol oxidase and its potential application in bioconversion of POPs"

6. **8th European Meeting on OxiZymes (Wageningen, the Netherlands 2016)**
    "Protein engineering of a catechol oxidase and its potential application in bioconversion of POPs"

5. **5th International Conference on Novel Enzymes (Groningen, the Netherlands 2016)**
    "Protein engineering of a polyphenol oxidase towards enhancement of its monophenolase activity"

4. **12th BIOTRANS (Vienna, Austria 2015)**
   "Study of the synthetic potential of a *Fusarium oxysporum* cutinase in water-oil biphasic reaction system"

3. **9th Joint Meeting in Medicinal Chemistry (Athens, Greece 2015)**
   "Enzymatic tailoring of oleuropein isolated from *Olea europaea* leaves"

2. **11th Carbohydrate Bioengineering Meeting (Espoo, Finland 2015)**
   "Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with poly(ethylene terephthalate) modification potential"

1. **16th European Congress on Biotechnology (Edinburgh, Scotland 2014)**
   "A cutinase from *Fusarium oxysporum* with potential for PET surface modification"

Συμμετοχές σε Εθνικά συνέδρια

7. **8th Mikrobiokosmos Conference (Patras, Greece 2019)**
   "Exploiting marine fungal biodiversity of the mesophotic zone for biodegradation of organic pollutants"

6. **11th Panhellenic Scientific Conference of Chemical Engineering (Thessaloniki, Greece 2017)**
   "Study of the enzymatic polymerization and mass postpolymerization towards poly(cuccinic butyl ester)"

5. **7th Mikrobiokosmos Conference (Athens, Greece 2017)**
   "Protein engineering of a polyphenoloxidase from fungus *Myceliophthora thermophila* aiming to the increase its monophenolase activity"

4. **6th Mikrobiokosmos Conference (Athens, Greece 2017)**
   "Discovery of marine-derived fungi with potential for persistent organic pollutant degradation"

3. **10th Panhellenic Scientific Conference of Chemical Engineering (Patras, Greece 2015)**

"Acylation of tyrosol in biphasic systems using a cutinase from the fungus *Fusarium oxysporum*"

2. **6th Mikrobiokosmos Conference (Athens, Greece 2015) -** *Oral presentation*
   "Structural and functional studies of a cutinase from *Fusarium oxysporum* with synthetic activity in water-oil biphasic systems and thermodynamic study of the reaction system"

1. **9th Panhellenic Scientific Conference of Chemical Engineering (Athens, Greece 2013)**
   "Surface modification of synthetic textile products using a cutinase from the fungus *Fusarium oxysporum*"

Συμμετοχές σε Εκπαιδευτικά σεμινάρια

3. **3rd International Meeting of the Hellenic Crystallographic Association's Young Researchers (Patras, Greece 2019) -** *Oral presentation*
   "Structural and functional characterization of a novel fungal polyphenol oxidase and its variants"

2. **Diffraction Data Collection Using Synchrotron Radiation Workshop by the German Crystallographic Society – DGK-AK1 (Berlin, Germany 2019) -** *Oral presentation*
   "Structural studies of a novel GH30 xylanase with unique catalytic properties"

1. **COST Action "Systems Biocatalysis" Training School (Siena, Italy 2016) -** *Oral presentation*
   "Heterologous expression, crystal structure, evolution and immobilization of a cutinase with a variety of applications"

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Ευάγγελου Τόπακα. Ο συγγραφέας χρηματοδοτήθηκε από τις Μεταπτυχιακές Υποτροφίες ΕΣΠΑ του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ), ενώ η διεξαχθείσα έρευνα από το Ευρωπαϊκό Ερευνητικό Πρόγραμμα TASCMAR (Horizon 2020 grant agreement no. 634674).

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, Ευάγγελο Τόπακα, για όλα όσα μου έχει προσφέρει ως τώρα. Η εμπιστοσύνη που μου έδειχνε με έκανε υπεύθυνο και με ωρίμασε ως ερευνητή. Δεν υπάρχουν λόγια να περιγράψω τον πλούτο τον γνώσεων και εμπειριών που απέκτησα δίπλα του, από την περίοδο της διπλωματικής μου εργασίας, μέχρι και την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής. Οι άπειρες γνώσεις του σε ένα μεγάλο φάσμα αντικειμένων και κυρίως οι βαθιές γνώσεις του στο αντικείμενο με το οποίο καταπιάστηκα, ήταν ένα από τα κίνητρά μου για να γίνομαι όλο και καλύτερος και να μαθαίνω όλο και περισσότερα. Η ανιδιοτελής αγάπη του για το εργαστήριο και η ανάγκη του να το βλέπει να ευημερεί και να εξελίσσεται ήταν σίγουρα μεταδοτικές. Η στήριξή του σε στιγμές απογοήτευσης και κούρασης ήταν ανεκτίμητες και με ωθούσαν να ξεπερνάω τις δυσκολίες και προσπαθώ όλο και πιο πολύ. Τον ευχαριστώ πραγματικά που υπήρξε μέντορας και πρότυπο για την ακαδημαϊκή μου πορεία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής. Τον κύριο Νικόλαο Φωκιαλάκη, για την συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια που προσέθεσε αξία στη διατριβή μου, αλλά και τον αξιότιμο κύριο Φραγκίσκο Κολίση, του οποίου το ενδιαφέρον για την πρόοδό μου και οι συμβουλές με γέμιζαν πάντα χαρά. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ ανήκει στη Μαρία Δημαρόγκωνα, μέλος της εξεταστικής μου επιτροπής και συνεργάτη χρόνων. Η διάθεσή της να μοιραστεί τις εμπειρίες και τις γνώσεις της με συντροφεύει από τη διπλωματική μου εργασία μέχρι και σήμερα. Η Μαρία είναι ο άνθρωπος που με μύησε στον μαγικό κόσμο της Κρυσταλλογραφίας και εξακολουθεί να μου μεταδίδει τις γνώσεις της πάνω στο αντικείμενο αυτό. Εύχομαι κάποια στιγμή να γίνω όσο καλός κρυσταλλογράφος είναι εκείνη.

Η συνεργασία είναι παράγοντας που κάνει την έρευνά μας καλύτερη. Έτσι, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αικατερίνη Τερμεντζή από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο και τη Δρ. Ειρήνη Μπαΐρα από τη Φαρμακευτική Σχολή του ΕΚΠΑ, των οποίων οι αναλύσεις μάζας ήταν κρίσιμες για την πορεία της διατριβής μου. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Jamal Ouazzani από το CNRS, ο οποίος μας παρείχε τον τεράστιο θησαυρό των θαλάσσιων στελεχών και μας δόθηκε έτσι η δυνατότητα να τον αξιοποιήσουμε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια του TECHNION-Israel Institute of Technology, Ayelet Fishman, για τη δίμηνη φιλοξενία που μου προσέφερε στο εργαστήριό της και για τις γνώσεις που έλαβα εκεί σχετικά με την πρωτεϊνική μηχανική και τη βιοκατάλυση. Η επίσκεψή μου στο Ισραήλ χρηματοδοτήθηκε από το COST action CM1303 (*Systems Biocatalysis*).

Ένας σημαντικός παράγοντας αύξησης της αποδοτικότητάς μου στο εργαστήριο ήταν οι συνοδοιπόροι υποψήφιοι διδάκτορες και μεταδιδάκτορες. Οι συμβουλές, η βοήθεια, η στήριξη, αλλά και ο υγιής ανταγωνισμός που αναπτύσσεται μεταξύ μας μάς κάνει να εξελισσόμαστε. Δεν υπάρχει άνθρωπος που να καταλαβαίνει καλύτερα τι βιώνεις, από αυτόν που βιώνει το ίδιο. Έτσι, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους Νατάσα Ζέρβα, Κώστα Κατσίμπουρα, Μαρία Κανελλή, Αγγελίνα Χαλιμά, Παναγιώτη Αγιουτάντη και Alicia Paz.

Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ πηγαίνει στους προπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα όλα αυτά τα χρόνια. Η δυνατότητα που μου δόθηκε να δουλέψω στενά και να μεταδώσω τις γνώσεις μου και τον ενθουσιασμό μου για την έρευνα σε διαφορετικούς χαρακτήρες, με ωρίμασε ως άνθρωπο και ερευνητή. Ιδιαιτέρως ευχαριστώ τους Γ. Νόρρα, Α. Χαλιμά, Α. Αγραφιώτη και Ρ. Σιαπέρα. Το γεγονός ότι όλοι σχεδόν οι διπλωματικοί μου φοιτητές, συνέχισαν την ακαδημαϊκή τους πορεία στην Ελλάδα ή το εξωτερικό με γεμίζει απερίγραπτη χαρά.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω, μέσα από την καρδιά μου, την αγαπημένη μου οικογένεια και κυρίως τους γονείς μου Φωτεινή και Λουκά. Οι άνθρωποι αυτοί είναι για μένα πρότυπα απίστευτης δύναμης, επιμονής και αφοσίωσης. Η στήριξη που μου δίνουν και η πίστη τους σε εμένα με οχυρώνουν ώστε να μπορώ να ανταπεξέλθω στα πάντα.

Συντμήσεις – Συμβολισμοί

PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon	Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
PCB	Polychlorinated Biphenyl	Πολυχλωριωμένα διφαινύλια
TCE	Trichloroethylane	Τριχλωροαιθυλένιο
BTEX	Benzene, Toluene, Ethyl benzene, Xylene	Βενζόλιο, αιθυλοβενζόλιο, τολουόλιο και ξυλόλιο
CP	Chlorophenol	Χλωροφαινόλη
DCP	Dichlorophenol	Διχλωροφαινόλη
TCP	Trichlorophenol	Τριχλωροφαινόλη
TeCPs	Tetrachlorophenol	Τετραχλωροφαινόλη
PCP	Pentachlorophenol	Πενταχλωροφαινόλη
IARC	International Agency for Research on Cancers	Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry	Οργανισμός για της Τοξικές Χημικές Ουσίες και το Μητρώο Νοσημάτων
POP	Persistent Organic Pollutants	Έμμονοι οργανικοί ρύποι
POPRC	POP Review Committee	Επιτροπή Αξιολόγησης των POP
COP	Conference Of the Parties	Διάσκεψη των Συμβαλλομένων Μερών
USEPA	United States Environmental Protection Agency	Οργανισμός προστασίας περιβάλλοντος των ΗΠΑ
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
NGS	Next Generation Sequencing	Αλληλούχιση νέας γενιάς
DMF	Dimethylformamide	Διμεθυλοφορμαμίδιο
MCOs	Multi-copper oxidases	Οξειδάσες φέρουσες πολλαπλά ιόντα χαλκού
EPR	Electron Paramagnetic Resonance	Παραμαγνητικός συντονισμός ηλεκτρονίων
PPO	Polyphenol oxidase	Πολυφαινολοξειδάση

C12O	Catechol 1,2-Dioxygenase	1,2-Διοξυγενάση της κατεχόλης
C23O	Catechol 2,3-Dioxygenase	2,3-Διοξυγενάση της κατεχόλης
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique	Εθνικό Κέντρο Επιστημονικής Έρευνας της Γαλλίας
PBS	Phosphate-buffered Saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή φωτοδιόδων
GC-ECD	Gas Chromatography-Electron Capture Detector	Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων
UHPLC-MS	Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry	Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένη με αναλυτή μαζών
ESI	Electrospray Ionization	Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
FT	Fourier Transform	Μετασχηματισμός Fourier

ABTS	2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)	
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου
L-DOPA	Levodopa	Λεβοντόπα
DMSO	Dimethylsulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξίδιο
*Tt*PPO	*Thermothelomyces thermophila* PPO	Η πρωτεΐνη PPO που προέρχεται από τον μύκητα *Thermothelomyces thermophila*

Περίληψη

Η παρούσα διδακτορική διατριβή στόχευσε στην ανακάλυψη και τροποποίηση βιοκαταλυτών με εφαρμογή στη βιοεξυγίανση χλωριωμένων αρωματικών ρύπων. Για την επίτευξη του στόχου αυτού ακολουθήθηκαν δύο μέθοδοι. Η μία βασίζεται στην εκμετάλλευση μικροοργανισμών που προέρχονται από ελάχιστα μελετημένα οικοσυστήματα και στη μελέτη των μηχανισμών με τους οποίους αυτοί αποτοξικοποιούν ξενοβιοτικά. Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στην *in silico* αναζήτηση και ανακάλυψη πρωτεϊνικών αλληλουχιών με πιθανότητα δράσης σε αρωματικούς ρύπους και η τροποποίηση των ενζύμων αυτών με εργαλεία πρωτεϊνικής μηχανικής, για τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους. Η έρευνα αυτή εμπίπτει τόσο στο πεδίο της Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας και στο πεδίο της Βιοκατάλυσης.

Στο πρώτο κομμάτι της διατριβής μελετήθηκε το δυναμικό 104 μυκητιακών στελεχών για τη βιομετατροπή δύο χλωριωμένων αρωματικών ρύπων, της 2,4-διχλωροφαινόλης (2,4-DCP) και του 2,4,5-τριχλωροδιφαινυλίου (PCB29). Οι μύκητες αυτοί είχαν απομονωθεί ως συμβιώτες θαλάσσιων ασπόνδυλων, τα οποία είχαν συλλεχθεί από διαφορετικές περιοχές του κόσμου και διαφορετικά βάθη.

Από τα στελέχη αυτά, 9 έδειξαν υψηλή δυνατότητα απομάκρυνσης 1 mM 2,4-DCP, σε ποσοστά υψηλότερα του 55%. Τα στελέχη αυτά ανήκαν στα γένη *Penicillium, Aspergillus, Chrysosporium, Cladosporium* και *Tritirachium*. Η ανάλυση μεταβολιτών των στελεχών αυτών αποκάλυψε πολλούς μεταβολίτες, κάποιοι εκ των οποίων αναφέρονται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, όπως τα συζεύγματα της 2,4-DCP με γλουταμίνη και κυστεΐνη, καθώς επίσης και ο παλμιτικός εστέρας της διχλωροκατεχόλης και η θειωμένη χλωροφαινόλη. Σε κάθε περίπτωση όλοι οι μεταβολίτες ήταν λιγότερο τοξικοί από την αρχική ένωση. Τα περισσότερα στελέχη μπόρεσαν να αποχλωριώσουν μερικώς ή πλήρως το ρύπο παράγοντας υδροξυκινόλη. Μάλιστα, το στέλεχος *Tritirachium* είχε τη δυνατότητα να πραγματοποιεί διάνοιξη του βενζολικού δακτυλίου, με την έκφραση ενός ενζύμου με δράση 1,2-διοξυγενάσης της κατεχόλης (C12O), παράγοντας υδροξυ-μουκονικό οξύ, αφομοιώνοντας πρακτικά το ρύπο.

Το ένζυμο με ενεργότητα C12O απομονώθηκε από το εξωκυτταρικό υγρό του μύκητα και χαρακτηρίστηκε βιοχημικά, παρουσιάζοντας πολύ ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά. Κατά την πρωτεομική ανάλυση, αποκαλύφθηκε ότι το ένζυμο αυτό είναι στην πραγματικότητα καταλάση με δράση C12O. Η διπλή αυτή καταλυτική δράση αναφέρεται για πρώτη φορά στη παγκόσμια βιβλιογραφία. Επίσης, ως C12O, το ένζυμο αυτό μπορούσε να διασπάσει και την 4-χλωροκατεχόλη εκτός από την κατεχόλη και την υδροξυκινόλη, γεγονός που το κάνει πολύ ελκυστικό σε εφαρμογές βιοεξυγίανσης.

Στη συνέχεια της έρευνας αναφορικά με τους θαλάσσια προερχόμενους μύκητες, μελετήθηκε η δυνατότητά τους να απομακρύνουν το PCB29 σε διαλύματα κορεσμένα με το ρύπο. Από τα 104 στελέχη, 8 κατάφεραν να απομακρύνουν το ρύπο σχεδόν εξολοκλήρου (>98.5%), τα οποία ανήκαν στα γένη *Penicillium*, *Aspergillus*, *Purpureocillium*, *Cladosporium* και *Alternaria*. Κατά τη διαδικασία απομάκρυνσης του ρύπου, κανένα από τα μελετούμενα στελέχη δεν εξέφραζε ενεργότητες διοξυγενασών του 2,3-διυδροξυ-διφαινυλίου, διοξυγενασών της κατεχόλης ή αφαλογονάσης των αλκανίων. Ένα, όμως, στέλεχος *Cladosporium* εξέφραζε ενεργότητα λακκάσης σε επίπεδα πολύ υψηλότερα από τα υπόλοιπα στελέχη.

Από το εξωκυτταρικό υγρό του στελέχους αυτού, πραγματοποιήθηκε απομόνωση δύο ισοενζύμων λακκάσης, ύστερα από καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου 12 L. Τα ένζυμα αυτά παρουσίασαν παρόμοια βιοχημικά χαρακτηριστικά, αναφορικά με τις βέλτιστες συνθήκες δράσης τους και το εύρος των υποστρωμάτων που μπορούν να οξειδώσουν. Το ένα από τα δύο όμως παρουσίασε τη δυνατότητα απομάκρυνσης του PCB29 σε ποσοστό 71% σε αντιδράσεις παρουσία μεσολαβητή.

Στο δεύτερο τμήμα της διατριβής πραγματοποιήθηκε η *in silico* ανακάλυψη, κλωνοποίηση και έκφραση ενός γονιδίου πολυφαινολοξειδάσης (PPO) από τον μύκητα *Thermothelomyces thermophila* στο ετερόλογο σύστημα *Pichia pastoris*. Ύστερα από εκτενή βιοχημικό χαρακτηρισμό του απομονωμένου ενζύμου, δοκιμάστηκε η χρήση του στην απομάκρυνση διαφόρων μονο- και δι-χλωροφαινολών. Με στόχο τόσο τη μελέτη της επίδρασης συγκεκριμένων

αμινοξέων στην στερεοεκλεκτικότητα του ενζύμου, όσο και την αύξηση της καταλυτικής του ενεργότητας σε διχλωροφαινόλες, πραγματοποιήθηκε η τροποποίησή του με σημειακές μεταλλάξεις. Από τα πέντε τροποποιημένα ένζυμα που κατασκευάστηκαν, στο ένα η ενεργότητα στην οξείδωση της 3,5-DCP πενταπλασιάστηκε με μόνο δύο μεταλλάξεις.

Abstract

The present thesis aimed to the discovery and modification of biocatalysts to be applied in the bioremediation of chlorinated aromatic pollutants. Two methods were followed in order to achieve this objective. One is based on the exploitation of microorganisms from poorly studied ecosystems and the study of the mechanisms by which they detoxify xenobiotics. The second method is based on the *in silico* search and discovery of protein sequences with potential activity on aromatic pollutants and modification of these enzymes by protein engineering tools in order to improve their properties. This research falls into both fields of Environmental Biotechnology and Biocatalysis.

In the first part of the thesis, the potential of 104 fungal strains for the biotransformation of two chlorinated aromatic pollutants, namely 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and 2,4,5-trichlorodiphenyl (PCB29) was studied. These fungi were isolated as symbionts of marine invertebrates, which were collected from different regions of the world and at different depths.

Nine of these strains showed high potential for the removal of 1 mM 2,4-DCP at yields above 55%. These strains belonged to the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium* and *Tritirachium*. Metabolite analysis of these strains revealed many compounds, some of which are reported for the first time in the literature, such as the conjugates of 2,4-DCP with glutamine and cysteine, as well as dichlorocatechol palmitate and sulfated chlorophenol. In every case, metabolites were less toxic than the original compound. Most strains were able to partially or completely dechlorinate the pollutant leading to hydroxyquinol. Furthermore, *Tritirachium* strain was able to cleave the benzene ring by expressing an enzyme with catechol 1,2-dioxygenase (C12O) activity, producing 2-hydroxy-muconic acid, effectively assimilating the pollutant.

The enzyme with C12O activity that was isolated from the extracellular culture medium of *Tritirachium* sp., was biochemically characterized, presenting very interesting features. Upon proteomic analysis, it was revealed that this enzyme is in fact a catalase with C12O activity. This is the first time in the

literature that such double catalytic action is mentioned. Additionally, as a C12O, this enzyme could cleave 4-chlorocatechol in addition to catechol and hydroxyquinol, which makes it very attractive in bioremediation applications.

The isolated marine-derived fungi were further investigated regarding their ability to remove PCB29 in solutions saturated with the pollutant. Out of the 104 strains tested, 8 were able to remove the pollutant almost entirely (>98.5%) and belonged to the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Purpureocillium*, *Cladosporium* and *Alternaria*. During the removal of PCB29 the studied strains did not express dihydroxyphenyl 2,3-dioxygenase, catechol dioxygenase or alkane dehalogenase activities. However, one *Cladosporium* strain expressed laccase activity at much higher levels than the rest of the strains.

Two laccase isozymes were isolated from the extracellular liquid of this strain after cultivation in a 12-L batch bioreactor. These enzymes exhibited similar biochemical characteristics, in terms of their optimum activity conditions and substrate scope. One of the two, however, showed the ability of PCB29 removal by 71% in the presence of a mediator.

In the second part of the thesis, the in silico discovery, cloning and expression of a polyphenoloxidase (PPO) gene from the fungus *Thermothelomyces thermophila* in *Pichia pastoris* heterologous expression system was performed. After extensive biochemical characterization of the isolated enzyme, its use in the removal of various mono- and dichlorophenols was tested. In order to study both the effect of specific amino acid residues on the enzyme's stereoselectivity and to increase its catalytic activity in dichlorophenols, its modification was performed by point mutations. Of the five variants that were constructed, one showed 5fold increase of oxidation activity on 3,5-DCP, with only two point mutations.

Περιεχόμενα

Συντμήσεις – Συμβολισμοί……..…. i

Περίληψη……...…….. v

Abstract….....ix

1 Περιβαλλοντική ρύπανση 1

1.1 Χλωροφαινόλες..... 3

1.1.1 2,4-Διχλωροφαινόλη (2,4-DCP) 7

1.2 Έμμονοι οργανικοί ρύποι..... 8

1.2.1 Πολυχλωριωμένα διφαινίλια (PCB) 12

1.3 Βιοεξυγίανση 16

2 Βιοκατάλυση 19

2.1 Ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων 21

2.1.1 Διαλογή με βάση τη λειτουργία..... 24

2.1.2 Διαλογή με βάση την αλληλουχία 25

2.2 Πρωτεϊνική Μηχανική 26

2.2.1 Κατευθυνόμενη εξέλιξη (Directed Evolution) 28

2.2.2 Ορθολογικός σχεδιασμός (Rational design)..... 29

2.2.3 Ημιορθολογικός σχεδιασμός (Semi-rational design) 30

2.3 Οικογένειες μελετώμενων ενζύμων..... 31

2.3.1 Λακκάσες..... 31

2.3.2 Πολυφαινολοξειδάσες 35

2.3.3 Διοξυγενάσες της κατεχόλης 37

3 Υλικά και Μέθοδοι 41

3.1 Χλωριωμένοι αρωματικοί ρύποι..... 41

3.2 Θαλάσσιοι μικροοργανισμοί..... 41

3.3 Μέθοδοι καλλιέργειας θαλάσσιων μικροοργανισμών 42

3.4 Διαλογή θαλάσσιων μικροοργανισμών για τη δυνατότητά τους να απομακρύνουν χλωριωμένους οργανικούς ρύπους 43

3.5 Αναλυτικές Τεχνικές 43

3.5.1 Υγρή χρωματογραφία (HPLC-DAD) 43

3.5.2 Αέρια χρωματογραφία (GC-ECD) 44

3.6 Ανάλυση μεταβολιτών 44

3.6.1 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με αναλυτή μάζας (UHPLC-MS)……44

3.6.2 Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με αναλυτή μαζών (GC-MS)……46

3.7 Μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων 47

3.7.1 Διοξυγενάσες της κατεχόλης 47

3.7.2 Λακκάση 48

3.7.3 Πολυφαινολοξειδάση 48

3.8 Απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός θαλάσσιων ενζύμων .. 48

3.8.1 Επαγωγή και απομόνωση ενεργότητας 1,2-διοξυγενάσης κατεχόλης (C12O) 48

3.8.2 Χαρακτηρισμός απομονωμένης C12O 49

3.8.3 Απομόνωση λακκασών 50

3.8.4 Χαρακτηρισμός απομονωμένων λακκασών 51

3.9 Πρωτεϊνικές αναλύσεις αλληλούχισης 53

3.10 Βιοχημικές μελέτες της πολυφαινολοξειδάσης (PPO) του *T. thermophila* 53

3.10.1 Κλωνοποίηση γονιδίου και μετασχηματισμός κυττάρων *Pichia pastoris* 53

3.10.2 Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένης *Tt*PPO..... 55

3.10.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός ανασυνδυασμένης *Tt*PPO 57

3.10.4 Σημειακές μεταλλάξεις της *Tt*PPO 58

3.10.5 Μετασχηματισμός χλωροφαινολών 58

4 Μελέτη του δυναμικού αποτοξικοποίησης της 2,4-DCP από θαλάσσιους μύκητες.....61

4.1 Μελέτη του μηχανισμού αποικοδόμησης της 2,4-DCP από τη μικροβιακή βιβλιοθήκη TARMIC..... 62

4.1.1 Ταυτοποίηση μεταβολιτών της 2,4-DCP από TARMIC στελέχη.....67

4.1.2 Μηχανισμοί στελεχών TARMIC για την αποτοξικοποίηση της 2,4-DCP 70

4.2 Μελέτη του μηχανισμού αποικοδόμησης της 2,4-DCP από τη μικροβιακή βιβλιοθήκη MICLIB 73

4.2.1 Μέτρηση εξωκυτταρικής ενεργότητας διοξυγενάσης της κατεχόλης.....75

4.2.2 Ταυτοποίηση μεταβολιτών της 2,4-DCP από MICLIB στελέχη77

4.2.3 Μηχανισμοί στελεχών MICLIB για την αποτοξικοποίηση της 2,4-DCP.....80

5 Μελέτη του δυναμικού απομάκρυνσης του PCB29 των θαλάσσιων μυκητιακών στελεχών 83

5.1 Απομάκρυνση PCB29 από θαλάσσιους μύκητες 84

5.2 Μέτρηση ενεργότητας λακκάσης 89

6 Ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων θαλάσσιας προέλευσης με πιθανές εφαρμογές στη βιοεξυγίανση 93

6.1 Απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός μιας C12O του μύκητα *Tritirachium* sp. ML197-S3 93

6.1.1 Απομόνωση ενεργότητας C21O με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής 93

6.2 Πρωτεομική και φασματομετρική ανάλυση της απομονωμένης πρωτεΐνης – Προσδιορισμός καινοτόμου δράσης ενζύμου 95

6.2.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της απομονωμένης CatC12O 98

6.3 Απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός δύο λακκασών του μύκητα *Cladosporium* sp. TM138-S3 105

6.3.1 Μελέτη διαφορετικών επαγωγέων στην έκφραση λακκάσης.. 105

6.3.2 Επίδραση συγκέντρωσης χαλκού στην έκφραση λακκάσης ... 106

6.3.3 Απομόνωση λακκασών με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής.. 108

6.3.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός 110

6.3.5 Μελέτη εξειδίκευσης των Lac1 και Lac2 ως προς το υπόστρωμα.....113

6.3.6 Απομάκρυνση του PCB29 με τις απομονωμένες λακκάσες.... 114

7 Ανακάλυψη, χαρακτηρισμός και πρωτεϊνική μηχανική μιας πολυφαινολοξειδάσης του μύκητα *T. thermophila* 117

7.1 Ανακάλυψη, κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου της *Tt*PPO 117

7.1.1 Κλωνοποίηση και ανάλυση αλληλουχίας της υποθετικής PPO.....118

7.1.2 Έκφραση και απομόνωση της *Tt*PPO 120

7.2 Χαρακτηρισμός της ανασυνδυασμένης *Tt*PPO 125

7.2.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης – Θερμοσταθερότητα..... 125

7.2.2 Εύρος υποστρωμάτων..... 127

7.3 Κατασκευή μοντέλου και επιλογή σημειακών μεταλλάξεων..... 132

7.4 Απομάκρυνση χλωροφαινολών με τις τροποποιημένες *Tt*PPO..... 134

8 Συμπεράσματα και Μελλοντικές προκλήσεις 139

Παράρτημα Εικόνων 186

Παράρτημα Πινάκων 189

Παράρτημα Διαγραμμάτων..... 191

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 Περιβαλλοντική ρύπανση

Η αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού και της ανθρωπογενούς δραστηριότητας έχει οδηγήσει σε υποβάθμιση της επιφάνειας της γης μέσω της κατάχρησης των περιβαλλοντικών πόρων και της ακατάλληλης διάθεσης των αποβλήτων. Επιπλέον, η εξέλιξη της επιστήμης και της τεχνολογίας, καθώς και η αύξηση της βιομηχανικής δραστηριότητας, οδήγησαν σε αύξηση της απόρριψης αποβλήτων στο περιβάλλον, από τα ακατέργαστα λύματα έως τα πυρηνικά απόβλητα, γεγονός που αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για την επιβίωση της ανθρωπότητας (Pushpanathan et al., 2014).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, υπάρχουν ήδη πάνω από 100.000 χημικά προϊόντα στην αγορά (Muir and Howard, 2006), τα οποία και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης ζωής του ανθρώπου. Η επανάσταση των χημικών προϊόντων συνέβαλε σε μεγάλο βαθμό στην ανθρώπινη ευημερία. Οι χημικές ουσίες έχουν αυξήσει τις γεωργικές αποδόσεις μέσω της προστασίας των καλλιεργειών από παράσιτα και έντομα, και έχουν καταστήσει δυνατή τη δημιουργία μιας ατελείωτης σειράς χρήσιμων προς τον άνθρωπο προϊόντων.

Οι γεωργικές πρακτικές και η βιομηχανική ανάπτυξη αποτελούν σημαντικά χαρακτηριστικά του ανθρώπινου πολιτισμού. Τις τελευταίες δεκαετίες, η υπερβολική χρήση φυτοφαρμάκων και χημικών λιπασμάτων στη γεωργία έχει οδηγήσει σε μόλυνση του περιβάλλοντος (νερό, ξηρά και αέρα). Η εκβιομηχάνιση έχει αρνητικές επιπτώσεις από τη σκόπιμη ή τυχαία απελευθέρωση τοξικών οργανικών και ανόργανων χημικών ουσιών και βαρέων μετάλλων που έχουν επίσης δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον. Τα θέματα αυτά είναι ιδιαίτερα έντονα στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου μπορεί να υπάρχει ταχεία εκβιομηχάνιση χωρίς ένα ισχυρό ρυθμιστικό πλαίσιο για τον έλεγχο της ρύπανσης που προκύπτει (Dangi et al., 2019). Σύμφωνα με την έκθεση της Κινεζικής Nationwide General Investigation το 2007, 25 εκατομμύρια τόνοι βιομηχανικών επικίνδυνων αποβλήτων είχαν παραχθεί μόνο στην Κίνα (Kumari et al., 2018).

Περιβαλλοντική ρύπανση ορίζεται ως η μόλυνση των φυσικών και βιολογικών συστατικών του συστήματος της γης/ατμόσφαιρας, με την εισαγωγή

επικίνδυνων αποβλήτων σε τέτοιο βαθμό, ώστε να επηρεάζονται δυσμενώς οι φυσιολογικές περιβαλλοντικές διεργασίες (Kumari et al., 2018; Muralikrishna and Manickam, 2017). Η ρύπανση του περιβάλλοντος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα του 21^{ου} αιώνα που προσελκύει την παγκόσμια προσοχή και τη λήψη αποφάσεων κατά προτεραιότητα. Με την πάροδο των ετών, τα επικίνδυνα απόβλητα προκαλούν σοβαρές και ανεπανόρθωτες ζημιές στη Γη και, ως εκ τούτου, έχουν καταστεί ζήτημα σοβαρής διεθνούς ανησυχίας (Kumari et al., 2018).

Οι ρύποι μπορεί να είναι φυσικές ουσίες ή ανθρωπογενείς ενώσεις, αλλά θεωρούνται μολυσματικές όταν υπερβαίνουν τα φυσικά επίπεδα. Οποιαδήποτε χρήση φυσικών πόρων με ρυθμό υψηλότερο από την ικανότητα αποκατάστασης της φύσης μπορεί να οδηγήσει σε ρύπανση του αέρα, του νερού και της γης. Γενικά, η περιβαλλοντική ρύπανση λαμβάνει χώρα όταν το περιβάλλον δεν μπορεί να επεξεργαστεί και να εξουδετερώσει επιβλαβή παραπροϊόντα ανθρώπινων δραστηριοτήτων, εν ευθέτω χρόνω, χωρίς καμία δομική ή λειτουργική βλάβη στο σύστημά του (Muralikrishna and Manickam, 2017).

Οι πιο σημαντικοί ρύποι που απελευθερώνονται στο περιβάλλον είναι οι χημικοί διαλύτες, τα χρώματα, τα βιομηχανικά παραπροϊόντα, οι πετρελαϊκοί και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – PAH), οι νιτροαρωματικές ενώσεις, τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB), το τριχλωροαιθυλένιο (TCE), οι φθαλικοί εστέρες, τα βενζόλιο, αιθυλοβενζόλιο, τολουόλιο και ξυλόλιο (Benzene, Toluene, Ethyl benzene, Xylene – BTEX), βαρέα μέταλλα και παρασιτοκτόνα. Αυτά τα χημικά, μετά την απελευθέρωσή τους, μπορούν να μεταφερθούν από τους ποταμούς στο θαλάσσιο περιβάλλον, ειδικότερα, στο παράκτιο θαλάσσιο οικοσύστημα. Η συνεχής μεταφορά τους μέσω εξάτμισης και συμπύκνωσης μπορεί να οδηγήσει στην παρουσία αυτών των ενώσεων ακόμα και στην ομίχλη, τη βροχή και το χιόνι, με επιζήμιες επιπτώσεις σε κάθε μέρος του περιβάλλοντος (Dangi et al., 2019).

Το πρόβλημα λοιπόν είναι παγκόσμιο και ο εκτιμώμενος αριθμός μολυσμένων περιοχών είναι σημαντικός. Η έκθεση σε αυτές τις χημικές ουσίες, άμεσα ή έμμεσα, προκαλεί προβλήματα υγείας και επηρεάζει αρνητικά όλες τις

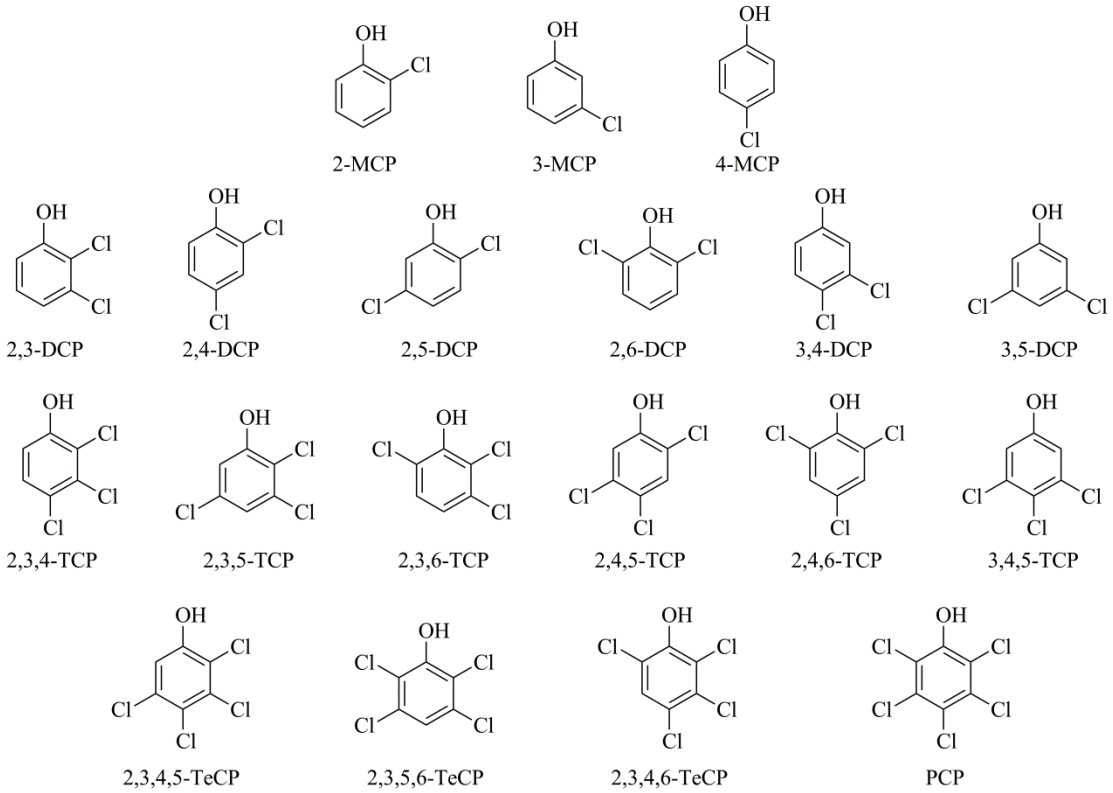
μορφές ζωής στη γη. Η ατμοσφαιρική ρύπανση είναι ο μεγαλύτερος περιβαλλοντικός κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία, καθώς ένας από τους εννέα θανάτους το 2012 αποδόθηκε στην ατμοσφαιρική ρύπανση. Σχεδόν το 80% του παγκόσμιου πληθυσμού εκτιμάται ότι υπόκειται σε υψηλό κίνδυνο ασφάλειας λόγω της ποιότητας της ατμόσφαιρας (Dangi et al., 2019).

Η αποκατάσταση των ρύπων τις τελευταίες δεκαετίες έχει επιτευχθεί σε μερικές περιπτώσεις χρησιμοποιώντας φυσικοχημικές μεθόδους όπως στερεοποιήσεις, διήθηση, αποτέφρωση, εξάτμιση, οξείδωση και αναγωγή, αντίστροφη όσμωση, χημική κατακρήμνιση, ηλεκτροχημική επεξεργασία και μεθόδους ιοντοεναλλαγής. Ωστόσο, το υψηλό κόστος επεξεργασίας, οι υψηλές απαιτήσεις αντιδραστηρίων, οι μεγάλες ποσότητες και η παραγωγή δευτερογενών περιβαλλοντικών ρύπων περιορίζουν αυτές τις συμβατικές προσεγγίσεις. Ο περιορισμός αυτών των μεθόδων γίνεται περισσότερο εμφανής στην περίπτωση των αποβλήτων ορυχείων, των μολυσμένων υπόγειων υδάτων και άλλων βιομηχανικών λυμάτων (Dangi et al., 2019).

Στις παρακάτω παραγράφους θα αναλυθούν οι περιβαλλοντικοί ρύποι που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

1.1 Χλωροφαινόλες

Χλωροφαινόλες (chlorophenols – CPs) χαρακτηρίζονται οι χημικές ενώσεις που αποτελούνται από ένα φαινολικό δακτύλιο (υδροξυλιωμένος βενζολικός δακτύλιος), ο οποίος είναι υποκατεστημένος με ένα έως πέντε άτομα χλωρίου. Ανάλογα με το βαθμό υποκατάστασης οι χλωροφαινόλες διακρίνονται σε μονο-χλωροφαινόλες (MCPs), δι-χλωροφαινόλες (DCPs), τρι-χλωροφαινόλες (TCPs), τετρα-χλωροφαινόλες (TeCPs) και την πεντα-χλωροφαινόλη (PCP). Συνολικά υπάρχουν 19 ομοειδείς ουσίες (congeners) της ομάδας των χλωροφαινολών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1.



Εικόνα 1.1 Δομή των όλων των πιθανών ομοειδών ουσιών της ομάδας των χλωροφαινολών

Οι χλωροφαινόλες προκαλούν σοβαρή ανησυχία λόγω της ευρείας παρουσίας τους στο περιβάλλον και πιο συγκεκριμένα σε λύματα, προϊόντα ιλύος, επιφανειακά αλλά και υπόγεια ύδατα. Η εισαγωγή τους στο περιβάλλον είναι συνήθως αποτέλεσμα χημικών και φαρμακευτικών βιομηχανικών δραστηριοτήτων, αλλά και της βιομηχανίας χάρτου. Άλλες πηγές ρύπανσης μπορεί να είναι οι τυχαίες διαρροές, οι χώροι διάθεσης επικίνδυνων αποβλήτων, οι δεξαμενές αποθήκευσης ή οι δημοτικοί χώροι υγειονομικής ταφής. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται επίσης ως βακτηριοκτόνα, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, συντηρητικά ξύλου και ως ενδιάμεσα στην παραγωγή βαφών και φαρμακευτικών προϊόντων. Επιπρόσθετα, χλωροφαινόλες σχηματίζονται κατά την καύση οργανικής ύλης, την αποτέφρωση αστικών αποβλήτων και την απολύμανση του νερού με χλώριο (El-Naas et al., 2017; Olaniran and Igbinosa, 2011).

Με εξαίρεση τη 2-CP, η οποία βρίσκεται σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, όλες οι υπόλοιπες χλωροφαινόλες είναι στερεές με σημεία τήξης να κυμαίνονται από 33-191 ºC. Σε υδατικά διαλύματα δρουν ως ασθενή οξέα, με την οξύτητα να αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός υποκατάστασης από χλώρια. Οι διαλυτότητά τους στο νερό είναι μικρή και μικραίνει με την αύξηση των ατόμων χλωρίου στο δακτύλιο, όμως τα αντίστοιχα άλατα που μπορεί να σχηματίσουν σε αντίδραση με βασικά μη-μέταλλα (νάτριο ή κάλιο) έχουν μέχρι και τέσσερις φορές υψηλότερη διαλυτότητα από τις αρχικές ουσίες. (El-Naas et al., 2017; Olaniran and Igbinosa, 2011).

Η μεταφορά και η κατάληξη μιας χημικής ένωσης στο φυσικό περιβάλλον εξαρτάται αυστηρά από την τιμή της σταθεράς διάστασης (*K*a) και τον συντελεστή κατανομής ($K_{o/w}$) στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Η σταθερά διάστασης εξαρτάται από τη δομή της ένωσης και από τον αριθμό των ατόμων χλωρίου στο μόριο. Στην περίπτωση των χλωροφαινολών, η σταθερά διάστασης αυξάνει αυξανομένου του αριθμού των ατόμων χλωρίου στην ένωση. Σε συνάρτηση με την τιμή του p*K*a, η διάσταση των χλωροφαινολών γίνεται πλήρως ή εν μέρει. Οι συντελεστές κατανομής οκτανόλης-νερού ($K_{o/w}$) αυξάνονται έντονα με τον αριθμό των ατόμων χλωρίου, ενώ παράλληλα μειώνεται η υδροφιλικότητα. Επίσης, ο βαθμός διάστασης των χλωροφαινολών αυξάνεται (υποδεικνύεται μείωση τιμής p*K*a) με την αύξηση του αριθμού των ατόμων χλωρίου (Czaplicka, 2004).

Έχει ακόμα αναφερθεί ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες των χλωροφαινολών, όπως η υδατοδιαλυτότητα, η σταθερά του νόμου Henry, ο συντελεστής ρόφησης οργανικού άνθρακα, ο ρυθμός πτητικότητας και ο ρυθμός φωτολύσεως καθορίζουν τις διεργασίες μεταφοράς αυτών των ενώσεων. Σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν αυτές τις διεργασίες περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα σε οργανικά υλικά και την περιεκτικότητα σε άργιλο στο έδαφος, τα ιζήματα και το νερό, καθώς οι χλωροφαινόλες απορροφώνται ειδικά σε αυτά τα συστατικά εδάφους. Γενικά, καθώς ο αριθμός των μορίων χλωρίου αυξάνεται, υπάρχει μείωση της πίεσης ατμών και διαλυτότητας στο νερό, με ταυτόχρονη αύξηση του σημείου βρασμού. Έτσι, η αυξανόμενη χλωρίωση αυξάνει την τάση

αυτών των ενώσεων να δεσμευτούν σε ιζήματα και λιπίδια και να βιοσυγκεντρωθούν (Ivanciuc et al., 2006).

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι οι χλωροφαινόλες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε υδάτινα περιβάλλοντα. Η κύρια πηγή της ρύπανσης των υδάτων από τις χλωροφαινόλες είναι η απόρριψη βιομηχανικών αποβλήτων και η έκπλυση χλωροφαινολών από χώρους υγειονομικής ταφής. Στην ατμόσφαιρα οι χλωροφαινόλες εισέρχονται μέσω εξάτμισης, κυρίως όμως οι μόνο- και δι-χλωροφαινόλες όντας οι πιο πτητικές. Μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό (περίπου 5%) των χλωροφαινολών εκπέμπονται στο περιβάλλον. Από την άλλη, οι μελέτες της συμπεριφοράς των ουσιών αυτών στο έδαφος είναι πολύ περιορισμένες (Olaniran and Igbinosa, 2011).

Οι χλωροφαινολικές ενώσεις είναι ανθεκτικές στη βιοαποικοδόμηση και συνεπώς είναι ανθεκτικές στο περιβάλλον. Λόγω της λιποφιλικότητάς τους μπορούν να μεταφερθούν μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και να βιοσυσσωρεύονται σε υδρόβιους οργανισμούς. Η έκθεση των ανθρώπων στις χλωροφαινόλες πραγματοποιείται με απορρόφηση του δέρματος, εισπνοή ή κατάποση από το στόμα. Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν ακριβείς τοξικοκινητικές μελέτες στον άνθρωπο, οι πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητά τους βασίζονται κυρίως σε μελέτες σε ζώα. (Olaniran and Igbinosa, 2011)

Σε γενικές γραμμές οι χλωροφαινόλες μπορεί να προκαλέσουν ενδοκρινικές διαταραχές (Terasaka et al., 2006), ενώ έχουν συσχετιστεί και με την καρκινογένεση (Hooived et al., 1998), το οξειδωτικό στρες (Bukowska et al., 2007), την απόπτωση (Michałowicz and Sicińska, 2009) και την τερατογένεση (Zhao et al., 1995).

Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancers – IARC) ταξινόμησε τις χλωροφαινόλες ως καρκινογόνα της Ομάδας 2B. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει χημικούς παράγοντες για τους οποίους έχουν αποδειχθεί επαρκείς ενδείξεις καρκινογένεσης στα ζώα και ανεπαρκείς ενδείξεις καρκινογένεσης στον άνθρωπο. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization – WHO) ταξινομεί ορισμένες χλωροφαινόλες

(2,4,6-τριχλωροφαινόλη, 2,4,5-τριχλωροφαινόλη και πεντα-χλωροφαινόλη) ως ενώσεις που υπάρχουν υπόνοιες ότι έχουν καρκινογόνες ιδιότητες, ενώ ο Οργανισμός για της Τοξικές Χημικές Ουσίες και το Μητρώο Νοσημάτων (Agency for Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR) κατηγοριοποίησε τις χλωροφαινόλες ως ρύπους προτεραιότητας (Honda and Kannan, 2018; Igbinosa et al., 2013).

Για την εξάλειψη των χλωροφαινολών από βιομηχανικά απόβλητα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές μέθοδοι αλλά καμία από αυτές τις μεθόδους ή οι συνδυασμοί τους δεν έχει καταφέρει να επιτύχει πλήρη ανοργανοποίηση των χλωροφαινολών (Olaniran and Igbinosa, 2011). Κάποιες από τις φυσικοχημικές μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα είναι φωτοκατάλυση, οζονίωση, εκχύλιση υγρού-υγρού ή υγρού-στερεού, προσρόφηση, ανταλλαγή ιόντων, διαχωρισμός με μεμβράνες, αντίδραση ηλεκτρο-Fenton, συνδυασμός πήξης και υπερηχητικής χημείας. Οι μέθοδοι αυτοί υφίστανται πολλά μειονεκτήματα, όπως το υψηλό λειτουργικό κόστος και η ελλιπής υποβάθμιση του ρύπου (Anku et al., 2017; Ren et al., 2016).

1.1.1 2,4-Διχλωροφαινόλη (2,4-DCP)

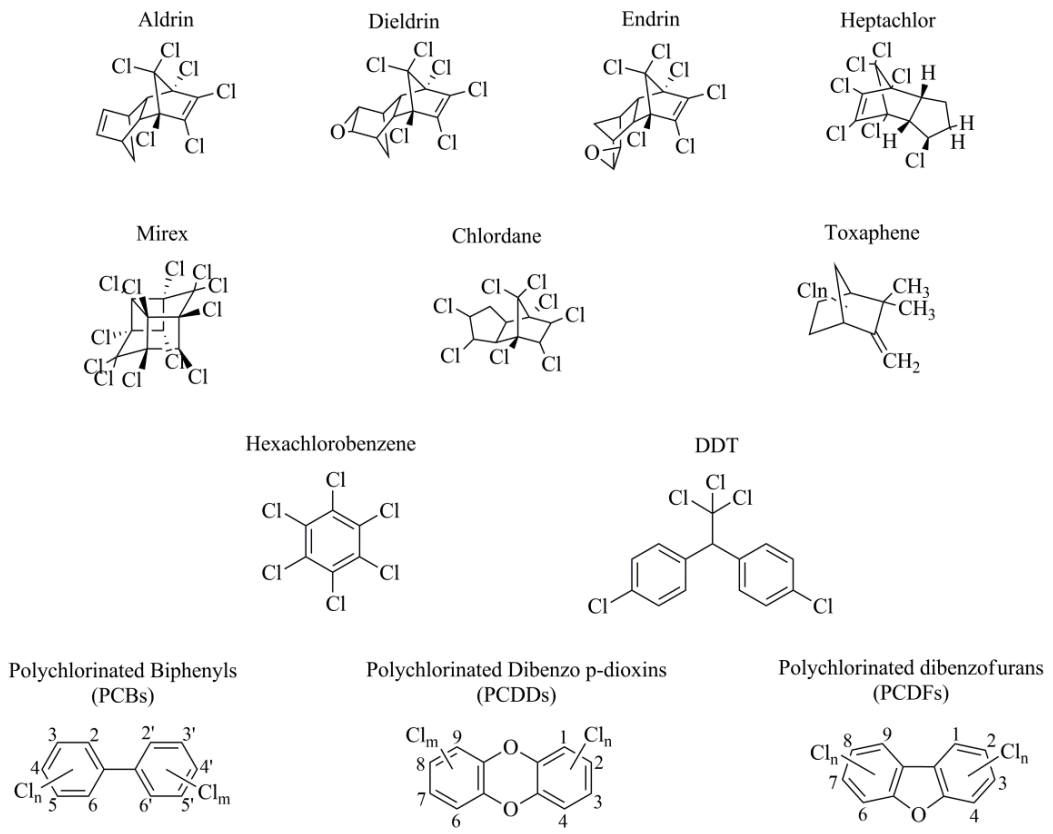
Η 2,4-διχλωροφαινόλη (2,4-DCP), αποτελεί ίσως την πιο διαδεδομένη χλωροφαινόλη στο εμπόριο καθώς έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μυκητοκτόνο, παρασιτοκτόνο και συντηρητικό ξύλου και έτσι απελευθερώνεται σε υψηλές ποσότητες στο περιβάλλον (περίπου 10000 kg στις ΗΠΑ κατά το 2014) (Huang et al., 2015). Παρόλο που οι χλωροφαινόλες με λιγότερα από τρία χλώρια στο μόριο τους δεν χρησιμοποιούνται ευρέως, η 2,4-DCP βρίσκει εφαρμογή στην παραγωγή υψηλότερα χλωριωμένων χλωροφαινολών αλλά και ζιζανιοκτόνων της οικογένειας του χλωροφαινόξυ οξικού οξέος (chlorophenoxyacetic acid herbicides). Μάλιστα, εκτιμάται ότι περίπου 40000 τόνοι 2,4-DCP παράγονται ετησίως για την παραγωγή του ζιζανιοκτόνου 2,4-διχλωροφαινόξυ οξικού οξέος (2,4-D) (Fahr et al., 1999; Khenifi et al., 2009; Vroumsia et al., 2005). Εκτός αυτού, η 2,4-DCP μαζί με τη 2-CP και την 4-CP είναι οι σημαντικότερες

χλωριωμένες φαινόλες που σχηματίζονται ως παραπροϊόντα χλωρίωσης του νερού (Olaniran and Igbinosa, 2011).

Λόγω της ευρείας διάδοσης της, η 2,4-DCP καταχωρήθηκε το 1978 ως ρύπος προτεραιότητας μαζί με άλλους 128 από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (Vroumsia et al., 2005), ενώ και η Ευρωπαϊκή Ένωση την ταξινόμησε σε μια παρόμοια λίστα το 1980, ορίζοντας ταυτόχρονα ανώτατα αποδεχτά όρια στο πόσιμο νερό (Patel and Kumar, 2017). Πολλές μελέτες έχουν γίνει με σκοπό την αποτοξικοποίηση περιοχών μολυσμένων από 2,4-DCP εξαιτίας των επιβλαβών επιπτώσεων της στους ζώντες οργανισμούς, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (ppb) (Khenifi et al., 2009).

1.2 Έμμονοι οργανικοί ρύποι

Η αναγνώριση και καταγραφή των έμμονων οργανικών ρύπων (persistent organic pollutants – POPs) ξεκίνησε το 2001 με την υπογραφή της Σύμβασης τη Στοκχόλμης από το Περιβαλλοντικό Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Environment Programme – UNEP). Αρχικά, η σύμβαση περιελάμβανε τις ενώσεις γνωστές ως “Dirty Dozen” (Εικόνα 1.2), οι οποίες είχαν ήδη χαρακτηριστεί ως επιβλαβείς για τον άνθρωπο και το οικοσύστημα (Ritter et al., 1995). Επιπρόσθετα, η Σύμβαση της Στοκχόλμης όρισε και κριτήρια και τις διαδικασίες με τις οποίες μια ένωση θα έμπαινε στη λίστα των POPs και πιο συγκεκριμένα σε ποια κατηγορία: Α-εξάλειψη της παραγωγής και χρήσης του ρύπου, Β-περιορισμός της παραγωγής και χρήσης του ρύπου και/ή C-μείωση της ακούσιας απελευθέρωσης των χημικών και περιορισμός της χρήσης τους. Με τον όρο εξάλειψη εννοείται το σταμάτημα της παραγωγής και χρήσης του ρύπου. Τα κύρια προαπαιτούμενα ώστε μια ουσία να τοποθετηθεί σε μία από τις παραπάνω κατηγορίες είναι να είναι έμμονη, βιοσυσσωρεύσιμη, να έχει τη δυνατότητα να μεταφέρεται σε μεγάλες αποστάσεις και να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία (*Final Act of the Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*, 2001).

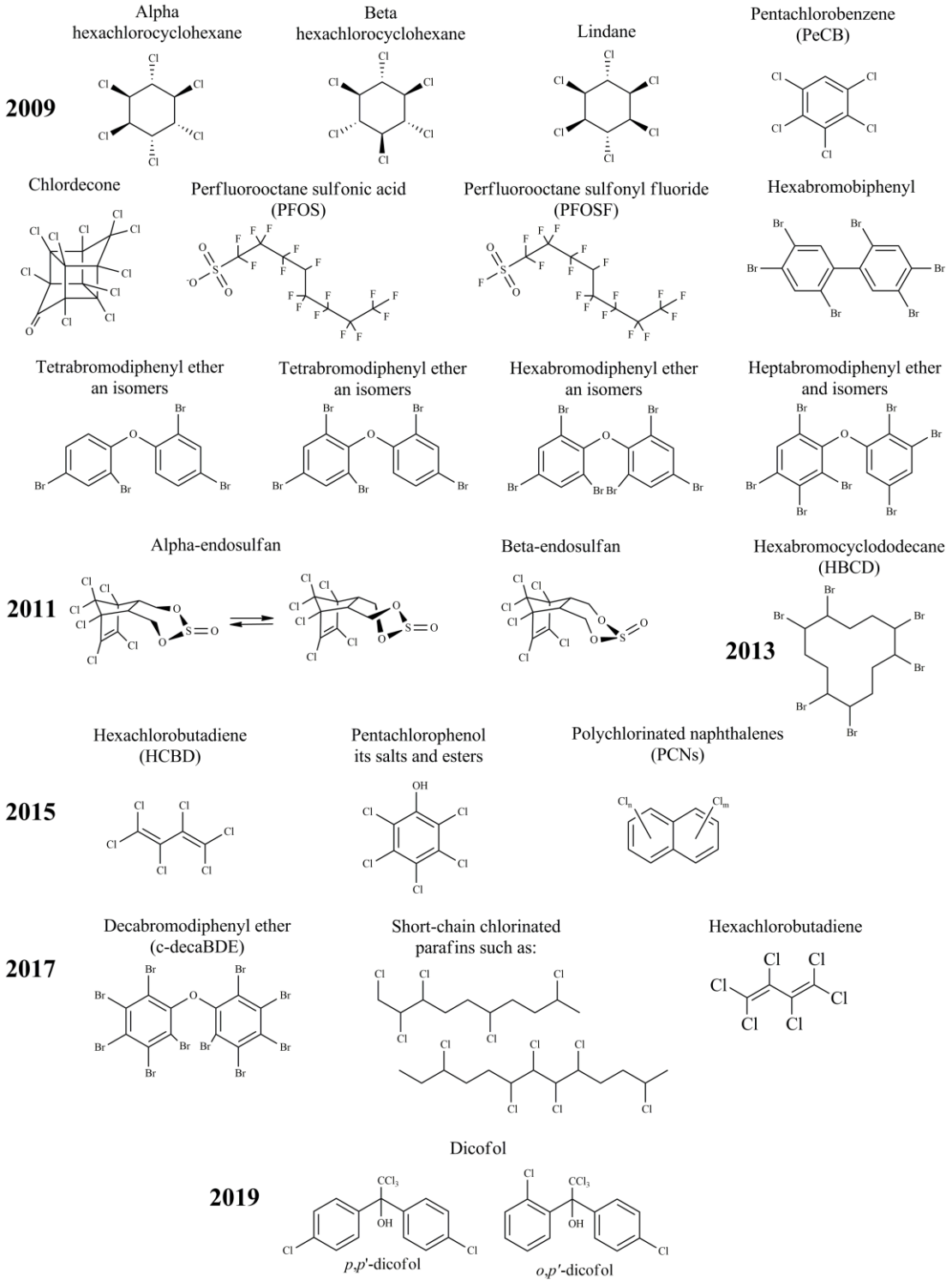


Εικόνα 1.2 Οι δώδεκα πρώτοι ρύποι, γνωστοί ως “Dirty Dozen” που υιοθετήθηκαν από τη Σύμβαση της Στοκχόλμης

Για κάθε ένα από αυτά τα κριτήρια, πρέπει να πληρούνται ορισμένοι περιορισμοί ώστε μια χημική ουσία να γίνει υποψήφια POP. Χρόνοι ημίσειας ζωής μεγαλύτεροι των 2 ημερών στον αέρα και 2-6 μηνών στο νερό και το έδαφος θεωρούνται επαρκείς για έναν υποψήφιο POP (Wahlström, 2003). Βιοσυσσώρευση είναι η δυνατότητα μιας ουσίας να προσροφάται από ζώντες οργανισμούς και να συσσωρεύεται στον λιπώδη ιστό, λόγω της υδροφοβικότητάς του. Κατ’ αυτόν τον τρόπο η ουσία αυτή μπορεί επιπλέον να μεταφερθεί μέσω της τροφικής αλυσίδας (Van Ael et al., 2013). Αναφορικά με αυτό έρευνες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις ισορροπίας στους ζώντες οργανισμούς είναι ανεξάρτητες του τροφικού τους επιπέδου, αλλά σχετιζόμενες με το ποσοστό λίπους του κάθε οργανισμού (Xia et al., 2015). Η ιδιότητα των ενώσεων να αντιστέκονται στην αποικοδόμηση, καθώς και οι μεγάλοι χρόνοι ημιζωής τους, τις καθιστούν υποψήφιες για δυνατότητα μεταφοράς σε μεγάλες αποστάσεις, σε

προηγουμένως παρθένες περιοχές χωρίς πρωτογενείς πηγές POP (Z. Zhao et al., 2012). Η μεταφορά αυτή δε δύναται να πραγματοποιηθεί μόνο μέσω του νερού, αλλά και μέσω της ατμόσφαιρας, μολύνοντας έτσι απομακρυσμένες περιοχές και ορεινές ζώνες, κάνοντας έτσι τους POPs ένα παγκόσμιο ζήτημα (Catalan, 2015; Lammel, 2015; Ruiz-Fernández et al., 2014; Zhao et al., 2015).

Η πρόσληψη των POPs από τους ανθρώπους, πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο μέσω της διατροφής (M.-L. Chen et al., 2012) και κυριότερα μέσω της κατανάλωσης προϊόντων ζωικής προέλευσης (Gasull et al., 2011). Θαλασσινά τρόφιμα (Perelló et al., 2015) προερχόμενα από μολυσμένες περιοχές και ιδιαίτερα τα ψάρια (Deribe et al., 2014; S.-H. Lee et al., 2014; Squadrone et al., 2014; Sun et al., 2014) έχουν μεγάλο μερίδιο στην πρόσληψη POPs από τον άνθρωπο. Άλλες πιθανές πηγές είναι το κρέας (Hernández et al., 2015) και τα λαχανικά (Khan and Cao, 2011), καθώς και το μητρικό γάλα (Chen et al., 2015; Croes et al., 2012) από το οποίο τα βρέφη έρχονται σε επαφή με υπολογίσιμες ποσότητες POPs ήδη από την αρχή της ζωής τους. Η έκθεση των νεογνών σε τέτοιες χημικές ουσίες, είτε προγεννητικά είτε μεταγεννητικά, έχει συνδεθεί με διάφορα θέματα υγείας σχετιζόμενα με την ανάπτυξη (Iszatt et al., 2015), την παχυσαρκία (Tang-Péronard et al., 2014; Vafeiadi et al., 2015), την υπέρταση (Vafeiadi et al., 2015), καθώς και με επιπτώσεις στην ανάπτυξη του νευρικού (Berghuis et al., 2015), ανοσοποιητικού και αναπνευστικού συστήματος (Gascon et al., 2013). Εκτός από τον βρεφικό πληθυσμό, η πρόσληψη POPs έχει αρνητικές επιπτώσεις και στην υγεία των ενηλίκων έχοντας σχετιστεί με καρκινογένεση (Boada et al., 2012; Hernández et al., 2015; Lim et al., 2015; Mitro et al., 2015), νοσήματα του μεταβολισμού (D.-H. Lee et al., 2014; Ruzzin, 2012) όπως παχυσαρκία (Dirinck et al., 2010; Lee et al., 2012; Reaves et al., 2015) και διαβήτη τύπου II (Jaacks and Staimez, 2015; Ngwa et al., 2015), καθώς και με άλλες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία (Arrebola et al., 2015; Crinnion, 2011; Grindler et al., 2015; Kvist et al., 2014; Lind et al., 2012; Vested et al., 2014).



Εικόνα 1.3 Οι χημικές ενώσεις που έχουν κατηγοριοποιηθεί ως έμμονοι οργανικοί ρύποι (POPs) μέχρι σήμερα

Με σκοπό την κατηγοριοποίησή τους ως POPs, οι χημικές ενώσεις που διέπονται από τα παραπάνω χαρακτηριστικά, δηλαδή εμμονή, βιοσυσσώρευση,

μεταφορά σε μεγάλες αποστάσεις και τοξικότητα αρχικά προτείνονται στην Επιτροπή Αξιολόγησης των POP (POP Review Committee – POPRC). Στη συνέχεια, η POPRC καταρτίζει ένα προφίλ κινδύνου και αξιολογεί τις πιθανές παγκόσμιες επιπτώσεις ενός χημικού-στόχου. Έπειτα, υποβάλλεται πρόταση στη Διάσκεψη των Συμβαλλομένων Μερών (Conference Of the Parties – COP), η οποία είναι το διοικητικό όργανο της Σύμβασης της Στοκχόλμης που αξιολογεί την πρόταση και τοποθετεί το συγκεκριμένο χημικό προϊόν σε μία από τις κατηγορίες A, B και/ή C. Πέραν των αρχικών δώδεκα POPs, η COP έχει εγκρίνει συστάσεις της POPRC για είκοσι μία νέες χημικές ουσίες, δώδεκα το 2009, από μία το 2011 και 2013, από τρεις το 2015 και 2017 και μία το 2019 (Εικόνα 1.3). Νέες προτάσεις που υποβλήθηκαν στο POPRC και εξετάζονται επί του παρόντος παρουσιάζονται επίσης στο Σχήμα 2Γ. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις ενέργειες, τις πρωτοβουλίες και τις αποφάσεις που λαμβάνονται στη Σύμβαση της Στοκχόλμης διατίθενται στην επίσημη ιστοσελίδα της (http://chm.pops.int/).

1.2.1 Πολυχλωριωμένα διφαινίλια (PCB)

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB) είναι μια κατηγορία αρωματικών χημικών ενώσεων στις οποίες ορισμένα ή όλα τα άτομα υδρογόνου που συνδέονται με τον πυρήνα του διφαινυλίου υποκαθίστανται από ένα έως δέκα άτομα χλωρίου. Υπάρχουν 209 ομοειδείς ουσίες, οι οποίες είναι διατεταγμένες σύμφωνα με την τρέχουσα ονοματολογία από τον αριθμό 1 έως 209 με αυξανόμενο αριθμό χλωρίων. Αν και οι φυσικές και χημικές ιδιότητες ποικίλλουν ευρέως μεταξύ τους, τα PCB γενικά έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, υψηλή λιποφιλικότητα και χαμηλή πίεση ατμών. Είναι χημικά σταθερά και γενικά εμμένουν στο περιβάλλον και στο ανθρώπινο σώμα.

Τα PCB όπως είναι γνωστό δεν παράγονται με φυσικό τρόπο και από το 1929 έχουν παραχθεί εμπορικά μόνο από περιορισμένο αριθμό εταιρειών. Η παραγωγή τους κορυφώθηκε μεταξύ της δεκαετίας του 1950 και του 1970 αλλά από τη δεκαετία του 1980 απαγορεύτηκε στις περισσότερες χώρες. Ωστόσο, η παραγωγή τους στη Λαϊκή Δημοκρατία της Κορέας συνέχισε τουλάχιστον μέχρι το 2006. Έχει αναφερθεί ότι από το 1920 μέχρι και τις αρχές της δεκαετίας του 1980,

περίπου 1,5 εκατομμύρια τόνοι PCB κατασκευάστηκαν σε ολόκληρο τον πλανήτη με αποτέλεσμα να απελευθερωθεί ένα σημαντικό ποσοστό PCB στο περιβάλλον. Λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους στο παρελθόν και της έλλειψης κατάλληλων τεχνολογιών διάθεσης, τα PCB έχουν εξαπλωθεί από την Αρκτική μέχρι την Ανταρκτική. Σύμφωνα με έκθεση της USEPA (2011), 350 περιοχές στις ΗΠΑ και 148 στον Καναδά έχουν μολυνθεί από PCB σύμφωνα με το Inventory of Federal Invented Sites (J. K. Sharma et al., 2018). Έχει υπολογιστεί ότι το συνολικό φορτίο PCB στο έδαφος ανέρχεται στους 21.000 τόνους (Meijer et al., 2003). Η συγκέντρωση κατωφλίου για μολυσμένο έδαφος κυμαίνεται μεταξύ 10 και 50 mg kg^{-1} σε ορισμένες χώρες, ενώ σε άλλες μπορεί να είναι τόσο χαμηλή όσο 0,5 mg kg^{-1}.

Εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα PCB κατασκευάζονται για να δώσουν ένα συγκεκριμένο βαθμό χλωρίωσης ώστε να ικανοποιήσουν κάποιες τεχνικές προδιαγραφές. Τα προϊόντα που πωλούνται με διαφορετικές εμπορικές ονομασίες, π.χ. Aroclor (Monsanto, USA), Santotherm (Mitsubishi, Ιαπωνία), Clophen (Bayer, Γερμανία) και Phenoclor and Pyralene (Prodolec, Γαλλία) μπορεί να έχουν παρόμοια σύνθεση σε σχέση με την περιεκτικότητα σε χλώριο. Ωστόσο, οι μεμονωμένες ομοειδείς ουσίες δεν έχουν ποσοτικοποιηθεί γενικά σε αυτά τα προϊόντα. Τα καθαρά PCB ομοειδή είναι κυρίως άχρωμα ή ελαφρώς κιτρινωπά, συχνά κρυσταλλικά συστατικά χωρίς οσμή. Τα εμπορικά προϊόντα, ωστόσο, είναι ιξώδη υγρά μίγματα αυτών των ενώσεων, με ιξώδες αυξανόμενο με το βαθμό χλωρίωσης και χρώμα που κυμαίνεται από ανοιχτό κίτρινο έως σκούρο χρώμα. Μια σημαντική ιδιότητα των PCB είναι η γενική αδράνεια τους, καθώς αντέχουν σε οξέα, βάσεις και οξειδωτικές ενώσεις ενώ είναι ανθεκτικά στη φωτιά λόγω των υψηλών σημείων ανάφλεξης.

Τα προϊόντα που περιέχουν PCB χρησιμοποιήθηκαν ευρέως σε διάφορες βιομηχανικές, εμπορικές και στρατιωτικές, ανοιχτές και κλειστές εφαρμογές, λόγω των φυσικών και χημικών τους ιδιοτήτων, όπως μη ευφλεκτότητα, χημική σταθερότητα, υψηλό σημείο ζέσεως και υψηλή διηλεκτρική σταθερά. Οι σημαντικότερες κλειστές εφαρμογές περιελάμβαναν τη χρήση τους ως διηλεκτρικά υγρά σε πυκνωτές και μετασχηματιστές και ως υδραυλικό υγρό και

μέσο μεταφοράς θερμότητας. Παρόλο που οι εφαρμογές αυτές θεωρούνται «κλειστές», τα PCB μπορούν να απελευθερωθούν στο περιβάλλον λόγω διαρροής. Οι σημαντικότερες ανοιχτές εφαρμογές περιελάμβαναν τη χρήση τους ως συστατικά μόνιμων ελαστικών σφραγιστικών υλικών, σε πολυμερή, και ως επιβραδυντικά φλόγας. Σε μικρότερο βαθμό, τα PCB χρησιμοποιήθηκαν επίσης σε μελάνια, κόλλες, μεταφορικούς ιμάντες και άλλα προϊόντα από καουτσούκ, μικρά στραγγαλιστικά πηνία για λαμπτήρες φθορισμού, λάδια κοπής και λίπανσης και μεταλλικές επενδύσεις. Σε όλες τις ανοιχτές εφαρμογές, τα PCB μπορούν να απελευθερωθούν από το προϊόν στο περιβάλλον μέσω πτητικότητας ή διάβρωσης (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2015; Patnaik, 2007).

Αφού απελευθερωθούν στο περιβάλλον, τα PCB μπορούν να μεταφερθούν μέσω περιβαλλοντικών μέσων και αποδημητικών ειδών μακριά από τον τόπο παραγωγής και χρήσης τους. Τα PCB βρίσκονται παντού στο περιβάλλον σε ζώντες οργανισμούς, στον αέρα, το έδαφος, τα ιζήματα και το νερό παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένων των πολικών περιοχών και των βαθιών ωκεανών. Οι συγκεντρώσεις PCB ποικίλλουν κατά αρκετές τάξεις μεγέθους ανάλογα με το μέσο, όπως επίσης και τα μοτίβα των ομοειδών ουσιών. Στο περιβάλλον, τα PCB εξαερώνονται εύκολα ή απορροφώνται από ψάρια και άλλα ζώα και μεταφέρονται στην τροφική αλυσίδα, όπου η συγκέντρωσή τους μπορεί να αυξηθεί.

Οι φυσικές ιδιότητες των PCB είναι σημαντικές για την κατανόηση των αναλυτικών, φυσιολογικών και περιβαλλοντικών ιδιοτήτων τους. Ωστόσο, οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων φυσικών ιδιοτήτων μπορεί να είναι εξαιρετικά πολύπλοκες (Erickson, 2001). Οι χημικές και φυσικές ιδιότητες όπως η διαλυτότητα, η τάση ατμών και η σταθερά του νόμου Henry έχουν αναφερθεί για μεμονωμένες ομοειδείς ουσίες. Τα σημεία ζέσεως αυξάνονται από τα λίγο (μονοχλωροδιφαινύλια, 285 ºC) έως τα πολύ (δεκαχλωροδιφαινύλιο, 456 ºC) χλωριωμένα ομοειδή (Shiu and Mackay, 1986). Η διαλυτότητα των PCB στο νερό είναι εξαιρετικά χαμηλή, κυμαινόμενη από 0,0012 έως 4830 μg/L για τις ομοειδείς ενώσεις που απαντώνται συχνότερα. Αντιθέτως, τα PCB είναι πλήρως διαλυτά σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες, έλαια και βιολογικά λιπίδια. Οι αναφερόμενες

τιμές log K_{ow} έχουν ανασκοπηθεί από τους (Shiu and Mackay, 1986). Φαίνεται να υπάρχει αξιοσημείωτη συσχέτιση μεταξύ του log K_{ow} (λιποφιλικότητα) και του αριθμού των ατόμων χλωρίου στο μόριο. Οι τιμές log K_{ow} κυμαίνονταν από 4,5 έως 8,3 και αυτή η κατανομή διαδραματίζει βασικό ρόλο στην περιβαλλοντική τύχη και τη μεταφορά. Τα PCB τείνουν να προτιμούν τη μη πολική φάση και απομακρύνονται από το νερό στα περισσότερα στερεά, προτιμώντας τα οργανικά τμήματά τους (Erickson, 2001). Τα PCB χαρακτηρίζονται από τις σταθερές του νόμου του Henry που τείνουν να μειώνονται με υψηλότερο βαθμό χλωρίωσης. Οι ομοειδείς ενώσεις με μικρότερο βαθμό χλωρίωσης έχουν σημαντικά υψηλότερη πίεση ατμών από τις πιο χλωριωμένες (Shiu and Mackay, 1986). Επομένως, η σύνθεση του αέρα σε PCB κυριαρχείται από τα λιγότερο χλωριωμένα ομοειδή και ατροποϊσομερή.

Αρκετές συμβατικές μέθοδοι για τη θεραπεία των PCB που έχουν δοκιμαστεί μέχρι τώρα περιλαμβάνουν: αποτέφρωση, υγειονομική ταφή, βυθοκόρυση, εκρόφηση χαμηλής θερμοκρασίας, εκχύλιση, χημική αφαλογόνωση και βιοεξυγίανση. Η αποτέφρωση μπορεί να προκαλέσει μεγαλύτερη απελευθέρωση της χλωριωμένης ένωσης στην ατμόσφαιρα υπό μορφή ατμών και/ή τη συσσώρευση στο έδαφος. Η μέθοδος επιτυγχάνεται σε υψηλότερη θερμοκρασία, δηλ. 1200 °C. Σε μια τέτοια θερμοκρασία, απομακρύνεται το 99,99% των ρυπογόνων ουσιών. Ωστόσο, η αποτέφρωση των επικίνδυνων αποβλήτων προκαλεί έκθεση σε θανατηφόρες εκπομπές. Επιπλέον, η διαδικασία αποτέφρωσης είναι πολύ δαπανηρή και χρονοβόρα. Η υγειονομική ταφή είναι ένας άλλος μηχανισμός εξάλειψης των PCB. Ο κίνδυνος της υγειονομικής ταφής περιλαμβάνει την εξάτμισή τους στην ατμόσφαιρα και τη μεταφορά τους στον περιβάλλοντα υδροφόρο ορίζοντα. Η μέθοδος αυτή αφήνει μολυσμένη την υδρόβια χλωρίδα και πανίδα με τις χλωριωμένες ενώσεις και άλλες ακαθαρσίες. Η βυθοκόρηση είναι μια άλλη συμβατική τεχνική απομάκρυνσης PCB. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάδευση του ιζήματος, προκαλώντας την επανεμφάνισή του, αυξάνοντας έτσι το επίπεδο της μολυντικής ουσίας στα επιφανειακά ύδατα. Ο συνδυασμός της βυθοκόρησης και της αποτέφρωσης έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την απομάκρυνση των PCB. Παρόλα αυτά, ολόκληρη η διάταξη είναι δαπανηρή και μπορεί να κοστίσει

περισσότερο από μισό εκατομμύριο δολάρια για την κατασκευή ενός χώρου επαρκούς μεγέθους για την αποκατάσταση αυτών των περιβαλλοντικών ρύπων (Nair and Abraham, 2019).

Λόγω των προαναφερθέντων η βιοεξυγίανση έχει προταθεί ως εναλλακτική στρατηγική για την απομάκρυνση των PCB και είναι η τεχνική που μελετάται στην παρούσα διατριβή.

1.3 Βιοεξυγίανση

Όπως αφήνεται να εννοηθεί παραπάνω, οι συμβατικές μέθοδοι απομάκρυνσης ρύπων όπως η εκταφή, η καύση και η χημική αποσύνθεση αποδείχθηκαν πιο περίπλοκες, αντιοικονομικές και επίσης δεν είχαν αποδοχή από το κοινό (Pushpanathan et al., 2014). Η βιοεξυγίανση ορίζεται ως η χρήση ζωντανών οργανισμών για την απομάκρυνση ρύπων από το έδαφος και το νερό, μια μέθοδος που θεωρείται πιο αποδοτική από πλευράς κόστους και φιλική προς το περιβάλλον από τις συμβατικές τεχνικές που αναφέρονται παραπάνω (Patel and Kumar, 2017; Ren et al., 2016).

Για την απομάκρυνση των τοξικών ουσιών από τα μολυσμένα περιβάλλοντα, έχει χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία πρόσφατα μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, φύκη και φυτά με αποτελεσματικές ιδιότητες εξυγίανσης. Οι μικροοργανισμοί υπάρχουν σε κάθε μέρος του πλανήτη μας και συμβάλλουν στη γεωχημεία του, στον κύκλο των στοιχείων και στην καταστροφή των αποβλήτων. Αυτή η ικανότητα των μικροοργανισμών βασίζεται στην τεράστια γενετική και μεταβολική ποικιλομορφία τους, η οποία προσφέρει μεγάλες δυνατότητες για την εφαρμογή τους σε βιοτεχνολογικούς σκοπούς. (Pushpanathan et al., 2014)

Η χρήση εγχώριων από μολυσμένες περιοχές μικροβίων για βιοαποκατάσταση είναι εξαιρετικά επωφελής διότι η ανάπτυξή τους επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το pH, τη θερμοκρασία, το οξυγόνο, τη δομή του εδάφους, την υγρασία και το κατάλληλο επίπεδο θρεπτικών ουσιών, την μικρή βιοδιαθεσιμότητα των ρύπων και την παρουσία άλλων τοξικών ενώσεων, τα οποία

περιορίζουν τη χρήση εξωγενών οργανισμών για την επεξεργασία μολυσμένων περιοχών. (Pushpanathan et al., 2014; Srivastava, 2015)

Τα μικρόβια βασίζονται κυρίως στα ένζυμα που παράγουν και τα οποία συμμετέχουν στα μεταβολικά τους μονοπάτια. Τα ένζυμα αυτά επιτίθενται στους ρύπους και τους αποικοδομούν εντελώς ή τους μετατρέπουν σε λιγότερο επιβλαβή προϊόντα. Η βιοαποκατάσταση με τη χρήση μικροβίων έχει ως τώρα επιτυχημένα και αποτυχημένα παραδείγματα. Σε περιπτώσεις αποτυχίας, τα αίτια είναι μπορεί να είναι η χαμηλή προσαρμοστικότητα των μικροβίων, ο μεγάλος χρόνος που είναι απαραίτητος για να υπάρξει αποτέλεσμα και η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα των ρυπογόνων στόχων (Dangi et al., 2019).

Με αυτή την έννοια, οι περιβαλλοντικές συνθήκες που είναι κατάλληλες για την ταχεία ανάπτυξη κάθε οργανισμού είναι και απαραίτητες για την αποτελεσματική βιοεξυγίανση. Η διεργασία αυτή μπορεί να γίνει πολύπλοκη όταν οι απαραίτητοι οργανισμοί έχουν αποκλίνουσες βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, ανασταλτικές σχέσεις ή όταν οι ρυπογόνοι παράγοντες είναι ανθεκτικοί σε βιοτικές επιθέσεις. Έτσι, η εφαρμογή ενζυμικών εκχυλισμάτων οργανισμών αντί των ίδιων των οργανισμών μπορεί να είναι περισσότερο αποδοτική, αφού είναι δυνατόν να παρέχεται ένας μεγαλύτερος έλεγχος διεργασίας (γνωστή ενζυμική συγκέντρωση), ταχύτερη και πιο ομοιογενής δράση, αποκατάσταση σύνθετων ενώσεων (ακόμα και κυτταροτοξικών), και μια πιο ελεγχόμενη και αποτελεσματική επεξεργασία (Okino-Delgado et al., 2019).

Τα τελευταία χρόνια, μικροβιακά ένζυμα που απομονώνονται από τα κύτταρα τους έχουν χρησιμοποιηθεί για βιοαποικοδόμηση σε σύγκριση με τη χρήση ολόκληρων μικροοργανισμών, για να ξεπεραστούν οι παραπάνω περιορισμοί (B. Sharma et al., 2018). Οι οικογένειες των ενζύμων που χρησιμοποιούνται ευρέως σε διεργασίες βιοαποικοδόμησης είναι κυρίως οξειδοαναγωγάσες (μονοοξυγενάσες, διοξυγενάσες, υπεροξειδάσες και λακκάσες) και υδρολάσες (πρωτεάσες και λιπάσες). Αυτά τα ένζυμα είναι ικανά να μετατρέπουν, μεταξύ άλλων, φαινόλες, αρωματικούς υδρογονάνθρακες, αρωματικές αμίνες, χλωριωμένες και μη χλωριωμένες ενώσεις, σε απλούστερες ή συζευγμένες και λιγότερο δραστικές ουσίες (Okino-Delgado et al., 2019).

2 Βιοκατάλυση

Βιοκατάλυση μπορεί να οριστεί ως η χρήση ενζύμων στην καθαρή μορφή τους, ή ως κυτταρικά εκχυλίσματα ή ολόκληρα κύτταρα για τη μετατροπή ενός υποστρώματος προς ένα προϊόν. Το υπόστρωμα αυτό θα μπορούσε να είναι μια ένωση διαφορετική από το φυσικό υπόστρωμα που μετατρέπει το ένζυμο στη φύση (Hughes and Lewis, 2018).

Τα ένζυμα μπορούν να θεωρηθούν ως ανανεώσιμοι καταλύτες. Σε αντίθεση με τους μεταλλικούς καταλύτες που χρησιμοποιούνται στην χημειοκατάλυση, οι οποίοι βασίζονται στην εξόρυξη και σε έντονες και ενεργοβόρες διεργασίες, οι βιοκαταλύτες είναι βιοδιασπώμενοι και εύκολα μπορούν να αντικατασταθούν χρησιμοποιώντας φθηνές και φιλικές προς το περιβάλλον διαδικασίες ζύμωσης (Hughes and Lewis, 2018).

Με την ευρεία ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας και την είσοδό της στις μοντέρνες οικονομίες, νέοι ορίζοντες έχουν ανοιχτεί προς βιώσιμες εξελίξεις. Τα ένζυμα αποτελούν μια αγορά περίπου 7 δισεκατομμυρίων δολαρίων ετησίως (για το 2018 www.luxresearchinc.com). Σήμερα, πάνω από 500 βιομηχανικά προϊόντα παρασκευάζονται με τη χρήση ενζύμων και περίπου 150 βιομηχανικές διεργασίες χρησιμοποιούν ένζυμα ή ολόκληρους μικροβιακούς καταλύτες (Ferrer et al., 2018).

Η βιοκατάλυση στην εποχή μας έχει φτάσει σε ένα βιομηχανικά καθορισμένο επίπεδο μέσω αρκετών κυμάτων τεχνολογικής εξέλιξης. Το πρώτο κύμα Βιοκατάλυσης άρχισε περισσότερο από έναν αιώνα πριν, όταν οι επιστήμονες συνειδητοποίησαν ότι τα συστατικά ολόκληρων ζωντανών κυττάρων - τα οποία ονομάζουμε σήμερα ένζυμα - θα μπορούσαν να πραγματοποιήσουν πολύτιμους χημικούς μετασχηματισμούς. Ένα παράδειγμα είναι η παραγωγή (R)-μανδενονιτριλίου από βενζαλδεϋδη και υδροκυάνιο με βιοκαταλύτες προερχόμενους από φυτά, παράγοντας ένα πρόδρομο της 1-εφεδρίνης με τη βοήθεια ολόκληρων κυττάρων ζύμης αρτοποιίας. Τα κύρια ζητήματα αυτών των διεργασιών ήταν η περιορισμένη διαθεσιμότητα και η χαμηλή σταθερότητα των βιοκαταλυτών. Τα ζητήματα αυτά αντιμετωπίστηκαν επιτυχώς με κλασικές

μεθόδους μικροβιακής και ενζυμικής διαλογής και ακινητοποίησης των βιοκαταλυτών, οι οποίες επίσης διευκόλυναν την επαναχρησιμοποίηση τους, ενίσχυσαν τη σταθερότητα και μείωσαν το κόστος τους (Poppe and Vértessy, 2018).

Κατά τη διάρκεια του δεύτερου κύματος Βιοκατάλυσης στο τελευταίο τέταρτο του 20ου αιώνα, τα νέα ένζυμα, τα μέσα διαλογής και οι πρώτες τεχνολογίες πρωτεϊνικής μηχανικής επέτρεψαν την επέκταση των υποστρωμάτων των ενζύμων σε μη φυσικές ενώσεις. Αυτή η ανάπτυξη μπόρεσε να δημιουργήσει αρκετές οικογένειες εξελιγμένων ενζύμων ως αναγνωρισμένα συνθετικά εργαλεία και έτσι η Βιοκατάλυση εισήχθη στον τομέα των φαρμακευτικών ενώσεων και της παραγωγής χημικών ουσιών. Εκτός από τη σταθεροποίηση και τον έλεγχο των μέσων, το βασικό μέλημα της περιόδου αυτής ήταν η βελτιστοποίηση του βιοκαταλύτη για δράση σε μη φυσικά υποστρώματα (Poppe and Vértessy, 2018).

Το τρίτο κύμα της Βιοκατάλυσης ξεκίνησε μετά τα μέσα της δεκαετίας του 1990, όταν εισήχθησαν προηγμένες μέθοδοι μοριακής βιολογίας, όπως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιρρεπή σε σφάλματα (error-prone PCR) και ανάμιξη (shuffling) DNA σε συνδυασμό με διαλογή υψηλής απόδοσης για την πραγματοποίηση ταχείας και εκτεταμένης τροποποίησης των βιοκαταλυτών εφαρμόζοντας μια *in vitro* έκδοση της Δαρβινικής εξέλιξης. Αυτές οι τεχνικές ονομάζονται τώρα "κατευθυνόμενη εξέλιξη". Οι πρώτες μέθοδοι έκαναν στοχαστικές μεταλλάξεις σε μια πρωτεΐνη, ακολουθούμενες από διαλογή υψηλής απόδοσης των βιβλιοθηκών που προέκυψαν για μεταλλάξεις με ενισχυμένες ιδιότητες όπως θερμοσταθερότητα, λειτουργική σταθερότητα, αποδοχή υποστρώματος και στερεοεκλεκτικότητα. Μεταγενέστερες εξελίξεις βελτίωσαν την αποτελεσματικότητα της κατευθυνόμενης εξέλιξης με τη δημιουργία "πιο έξυπνων" βιβλιοθηκών και πιο εξελιγμένων τεχνικών διαλογής (Poppe and Vértessy, 2018).

Το τέταρτο κύμα της Βιοκατάλυσης το οποίο βιώνουμε σήμερα ενσωματώνει εργαλεία προχωρημένης μοριακής γενετικής, μεταγονιδιωματικής και βιοπληροφορικής για την ανακάλυψη νέων ενζύμων ή ακόμη και τη δημιουργία νέων ενζυμικών δυνατοτήτων που δεν υπάρχουν στη φύση, με εξελίξεις σε

διεργασίες που καταλύονται από πολυένζυμα, στις τεχνολογίες ακινητοποίησης και μικροαντιδραστήρων. Οι προηγμένες μέθοδοι για την ανακάλυψη/ανάπτυξη καινοτόμων ενζύμων θα μπορούσαν να εφαρμοστούν *in vivo* ως τμήμα νέων τεχνητών μεταβολικών οδών σε ολόκληρα κύτταρα ή *in vitro* με τη βοήθεια τεχνικών διαμερισματοποίησης και μικροαντιδραστήρων για τη δημιουργία συστημάτων αντιδραστήρων με βάση τα πολυένζυμα (Poppe and Vértessy, 2018).

Η Βιοκατάλυση βρίσκει σήμερα εφαρμογές στις εξής βιομηχανικές διεργασίες: σύνθεση χημικών ενώσεων σε μεγάλες ποσότητες (bulk chemicals), αλλά και αντιδραστηρίων υψηλής καθαρότητας (fine chemicals), φαρμακευτικές ενώσεις, τρόφιμα, καλλυντικά, υφάσματα και στην χαρτοβιομηχανία (Choi et al., 2015).

Σημαντικά πεδία μελέτης στη σύγχρονη Βιοκατάλυση είναι: ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων με σκοπό τη διεύρυνση της εφαρμοσιμότητας της βιοκατάλυσης, μελέτη του εύρους μη φυσικών υποστρωμάτων που καταλύουν οι ήδη υπάρχοντες βιοκαταλύτες και βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης, ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων ακινητοποίησης για τη βελτίωση των ιδιοτήτων των βιοκαταλυτών, εφαρμογή της πρωτεϊνικής μηχανικής για μεταβολή ή/και βελτίωση των ιδιοτήτων των βιοκαταλυτών, ανάπτυξη συστημάτων πολυενζύμων που θα μιμούνται μεταβολικά μονοπάτια για την πραγματοποίηση συνθέσεων *in vivo* και *in vitro* (Poppe and Vértessy, 2018).

Μέρος της έρευνας που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, εμπίπτει στα πεδία μελέτης της Βιοκατάλυσης που αφορούν την ανακάλυψη καινοτόμων βιοκαταλυτών και τη χρήση μέσων πρωτεϊνικής μηχανικής για την τροποποίηση των ιδιοτήτων των ενζύμων.

2.1 Ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων

Οι συνεχώς διευρυμένες δραστηριότητες της βιοτεχνολογίας έχουν δημιουργήσει την ανάγκη για νέους βιοκαταλύτες με διαφορετικές ιδιότητες, οι οποίοι προορίζονται για διαφορετικές εφαρμογές. Οι βιοκαταλύτες αυτοί μπορεί

να βρουν εφαρμογή ή ακόμα και να δημιουργήσουν νέα μονοπάτια στο πεδίο της Βιοτεχνολογίας (Nikolaivits et al., 2017).

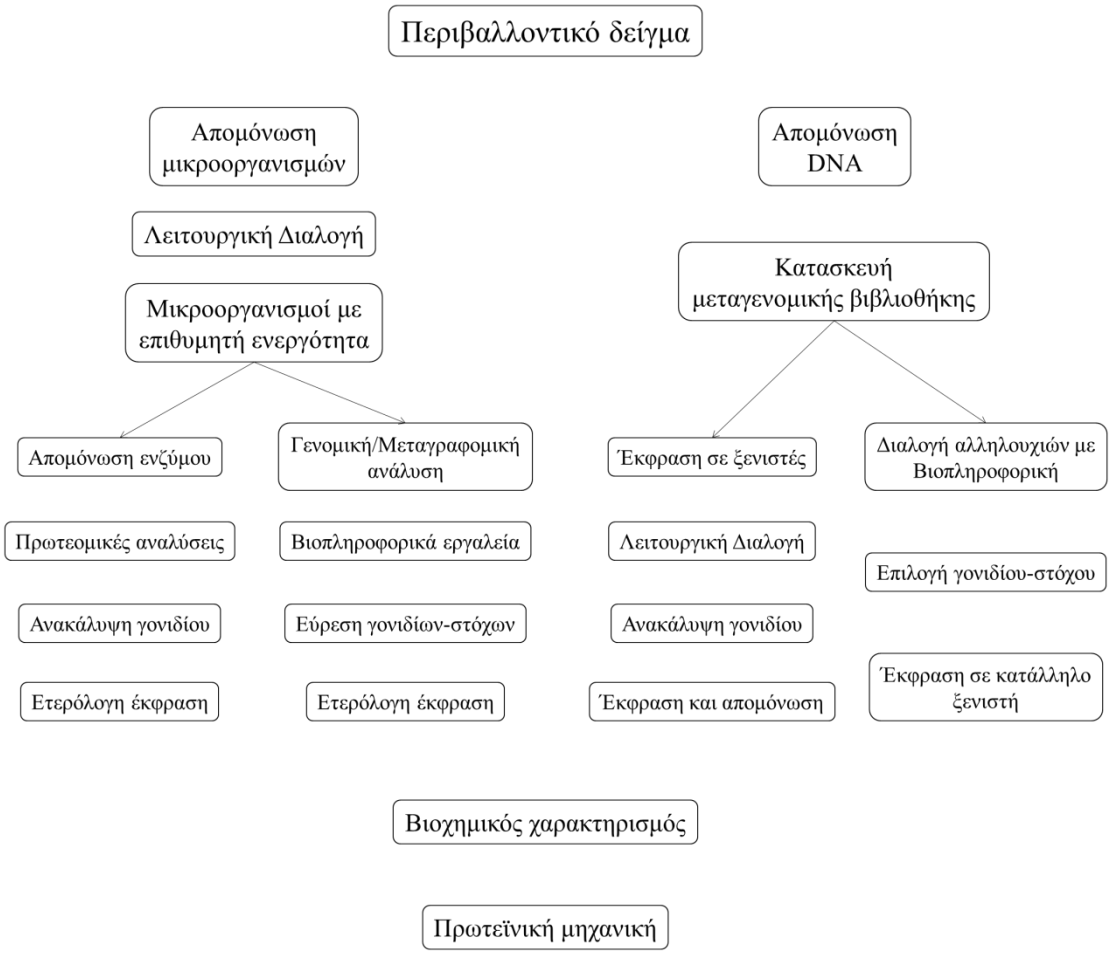
Τα μικρόβια αντιπροσωπεύουν το 60% της συνολικής βιομάζας στη γη και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη βιωσιμότητα του πλανήτη (Dionisi et al., 2012). Για 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια, τα μικρόβια έχουν συσσωρεύσει μεταλλάξεις που οδήγησαν σε υψηλή γενετική και λειτουργική ποικιλομορφία, καθιστώντας τα μια απύθμενη δεξαμενή γενετικών πόρων (Sogin et al., 2006).

Τα περισσότερα βιομηχανικά σημαντικά ένζυμα είναι μικροβιακής προέλευσης και η ανακάλυψη, ο καθαρισμός και η παρασκευή τους αποτελούν βασικά βήματα σε βιομηχανικές διεργασίες. Η φύση και η σύγχρονη μικροβιολογία επιτρέπει την άνευ προηγουμένου πρόσβαση σε μία τεράστια ποικιλία ενζύμων. Ωστόσο, μπορούμε να καλλιεργούμε μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό των μικροοργανισμών ενός περιβαλλοντικού δείγματος και το ποσοστό αυτό μειώνεται σημαντικά όταν εξετάζονται στελέχη που προέρχονται από ιδιαίτερα περιβάλλοντα. Αυτό που επισημοποιήθηκε το 1985 ως "η μεγάλη ανωμαλία μετρήσεων τρυβλίου" (the great plate count anomaly) (Staley and Konopka, 1985), περιγράφει ακριβώς αυτό το φράγμα. Περίπου 1% των μικροοργανισμών που περιλαμβάνονται σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα μπορούν να καλλιεργηθούν σε εργαστηριακές συνθήκες. Παρά το γεγονός ότι τα περισσότερα δείγματα κυριαρχούνται από συγκεκριμένα είδη, σε πολλές περιπτώσεις είναι ακριβώς αυτά τα είδη που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο (Seymour, 2014). Από την άλλη, σπάνια είδη που δεν μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν με μοριακές τεχνικές, είναι αυτά που καλλιεργούνται εύκολα σε εργαστηριακές συνθήκες (Pedrós-Alió, 2006).

Γι αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί αρκετές στρατηγικές για το πώς να εκμεταλλευόμαστε τη μεγάλη πηγή ενζύμων που περιέχονται στις βάσεις δεδομένων γονιδιωματικής και μεταγονιδιωματικής, με σκοπό την ανακάλυψη καινοτόμων βιοκαταλυτών (Zaparucha et al., 2018). Ένα σημαντικό εμπόδιο, όμως, στην ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων σε αυτήν την εποχή των αυξανόμενων γονιδιωματικών και μεταγονιδιωματικών δεδομένων είναι από τη μία η ποικιλία των δειγμάτων και από την άλλη η ικανότητά μας να αναλύσουμε

όλα αυτά τα δεδομένα. Το πρώτο μπορεί να λυθεί με τη λήψη δειγμάτων από χιλιάδες διαφορετικές περιοχές σε όλο τον πλανήτη στις οποίες μπορεί να επικρατούν ακραίες συνθήκες, ενώ το δεύτερο με νέες τεχνολογίες διαλογής όπως βιοπληροφορικά εργαλεία και συστήματα έκφρασης.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.1, υπάρχουν δύο κύριες στρατηγικές για την ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων. Η πρώτη θεωρείται η παραδοσιακή και βασίζεται στην απομόνωση μικροοργανισμών, ενώ η δεύτερη χρησιμοποιεί απομονωμένο DNA από περιβαλλοντικά δείγματα. Και στις δύο περιπτώσεις η διαλογή και η ανακάλυψη των νέων ενζύμων μπορεί να γίνει είτε με λειτουργική διαλογή (δηλαδή βασισμένη στην ενζυμική ενεργότητα), είτε με διαλογή με βάση την αλληλουχία γονιδίων, που βασίζεται στη χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων.



Εικόνα 2.1 Στρατηγικές για την ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων από περιβαλλοντικά δείγματα.

2.1.1 Διαλογή με βάση τη λειτουργία

Για την ανακάλυψη ενζύμων από καλλιεργήσιμους μικροοργανισμούς, υπάρχει η δυνατότητα διαλογής με βάση την ενζυμική ενεργότητα, χρησιμοποιώντας την κατάλληλη ενζυμική δοκιμασία (enzymatic assay). Στην περίπτωση αυτή, λόγω του πεπερασμένου αριθμού απομονωμένων μικροοργανισμών δεν υπάρχει ανάγκη για συστήματα διαλογής υψηλής απόδοσης. Από την άλλη, στις περιπτώσεις διαλογής μεταγενωμικής βιβλιοθήκης, οι απαιτήσεις για αποδοτική διαλογή είναι μεγαλύτερες. Η διαδικασία διαλογής πραγματοποιείται και στις δύο μεθόδους χωρίς υπερέκφραση της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα περιορισμένη ευαισθησία. Εκτιμάται ότι η βιοτεχνολογία έχει χάσει έως και 99% των υφιστάμενων μικροβιακών πόρων χρησιμοποιώντας παραδοσιακές τεχνικές διαλογής. Επιπρόσθετα, η χρήση κλασικών μεθόδων χρωματογραφίας για την απομόνωση των παραγόμενων πρωτεϊνών από φυσικά στελέχη είναι μία χρονοβόρα διαδικασία κατά την οποία τις περισσότερες φορές η πρωτεΐνη χάνει μεγάλο μέρος της καταλυτικής της δράσης (Zaparucha et al., 2018). Η λειτουργική διαλογή μικροοργανισμών, παρότι θεωρείται μια δύσκολη προσέγγιση που περιλαμβάνει κοπιαστικές και αργές διαδικασίες, μας δίνει την ευκαιρία να οδηγηθούμε στην ανακάλυψη πραγματικά καινοτόμων βιοκαταλυτών (Kennedy et al., 2008; Troeschel et al., 2012).

Τα ένζυμα γενικά εκφράζονται σε χαμηλές ποσότητες σε φυσικούς οργανισμούς και είναι δύσκολο να απομονωθούν και να παραχθούν μαζικά. Ως εκ τούτου, οι εφαρμογές και η διάδοσή τους είναι περιορισμένες. Με την καθιέρωση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA μπορούμε να κλωνοποιήσουμε ευκολότερα μια ποικιλία φυσικών γονιδίων και να τα εκφράσουμε σε μικροβιακά συστήματα με υψηλή απόδοση, πράγμα που εξασθένησε σε μεγάλο βαθμό την εξάρτηση από πηγές φυσικών ενζύμων. Αυτή η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA εφαρμόζεται με επιτυχία στη βιομηχανική παραγωγή ενζύμων. Για παράδειγμα, το 80% των ενζύμων που παράγει η Novozymes στη Δανία, ο μεγαλύτερος κατασκευαστής βιομηχανικών ενζύμων στον κόσμο, είναι προϊόντα γενετικής μηχανικής (Deng et al., 2019).

2.1.2 Διαλογή με βάση την αλληλουχία

Η πληροφορία γονιδιωματικών αλληλουχιών καθιστά δυνατή την άμεση κλωνοποίηση των στοχευόμενων γονιδίων χρησιμοποιώντας αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και επομένως μια αποτελεσματική έκφραση σε ένα κατάλληλο ετερόλογο στέλεχος. Η εμφάνιση νέας γενιάς μεθόδων αλληλούχισης (Next Generation Sequencing, NGS) στα μέσα του 2000 δημιούργησε μια απίστευτη ποσότητα υποθετικών πρωτεϊνικών ακολουθιών που κατατέθηκαν σε βάσεις δεδομένων. Τον Οκτώβριο του 2016 περίπου 67.000.000 αλληλουχίες πρωτεϊνών από 509.000 είδη είχαν κατατεθεί στη βάση δεδομένων TrEMBL (www.uniprot.org/uniprot/TrEMBL) και αναμένονται περισσότερες ακολουθίες στο μέλλον. Επιπροσθέτως, η βαθιά αλληλούχιση των μεταγονιδιωμάτων από διάφορα περιβάλλοντα προσφέρει μια τεράστια δεξαμενή νέων ενζύμων που αντανακλούν συγκεκριμένες μεταβολικές απαιτήσεις για μια ορισμένη διαδικασία (π.χ. την επεξεργασία των λυμάτων, τη βιοεξυγίανση κτλ) ή μια ιδιαίτερη οικολογική περιοχή (Zaparucha et al., 2018).

Η εξερεύνηση της εξαιρετικά μεγάλης ποσότητας διαθέσιμων γονιδιωματικών πόρων μπορεί να εξορθολογιστεί έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η πειραματική προσπάθεια με υπολογιστικές μεθόδους που προσπαθούν να αποκαλύψουν τις σχέσεις αλληλουχίας/λειτουργίας πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά, χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων για την ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης DNA, τα οποία βασίζονται σε συντηρημένες αλληλουχίες το πιο πιθανό είναι να παραβλέψουν τελείως καινοτόμα γονίδια (Barone et al., 2014; Kennedy et al., 2010).

Μία πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση παρέχει λεπτομερή ανάλυση σχετικά με τα επιτεύγματα της ανακάλυψης βιοκαταλυτών από μεταγονιδιωματικά δεδομένα (Ferrer et al., 2015). Εκτιμάται ότι η πλειοψηφία των ενζύμων που έχουν ανακαλυφθεί είναι εστεράσες και λιπάσες (68%), ακολουθούμενες από γλυκοζυλο-υδρολάσες (16%) και οξειδοαναγωγάσες (14%). Αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να αποδοθεί στα καθιερωμένα πρωτόκολλα για τη λειτουργική διαλογή αυτών των ενεργοτήτων. Περαιτέρω, όσον αφορά τα λιπολυτικά ένζυμα, 200 υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη

διαλογή τους, υποστηρίζοντας την ανάγκη για την ανάπτυξη ισχυρών ευαίσθητων τεχνικών διαλογής και για άλλες ενζυμικές δραστικότητες. Εκτιμάται ότι μόνο το 12% όλων των μεταγονιδιωματικών ερευνών κατέληξε σε απομόνωση πραγματικών ενζυμικών ενεργοτήτων, και από αυτές τις περιπτώσεις η λειτουργική διαλογή οδήγησε σε 30 φορές περισσότερες ανακαλύψεις από ότι η διαλογή με βάση την αλληλουχία.

Η ικανότητα ενός ενζύμου να μετασχηματίζει όχι μόνο το μεταβολικό του υπόστρωμα, αλλά και να καταλύει την ίδια χημική αντίδραση για μια σειρά διαφορετικών υποστρωμάτων, επεκτείνει το πεδίο των δυνατοτήτων βιοκατάλυσης. Η έρευνα για νέους βιοκαταλύτες στη συνέχεια στηρίζεται κυρίως στην υπόθεση της ευρείας αποδοχής υποστρωμάτων από τα ένζυμα (substrate promiscuity), δεδομένου ότι τα μη φυσικά υποστρώματα είναι συχνοί στόχοι στην οργανική σύνθεση (Zaparucha et al., 2018). Η επιστήμη εκμεταλλεύεται αυτή ακριβώς την ιδιότητα των ενζύμων την οποία μπορεί να εξελίξει με μεθόδους πρωτεϊνικής μηχανικής. Δηλαδή, μπορεί να κάνει ένα ένζυμο το οποίο δέχεται μια γκάμα υποστρωμάτων, να εξειδικευτεί σε ένα συγκεκριμένο με υψηλή αποδοτικότητα.

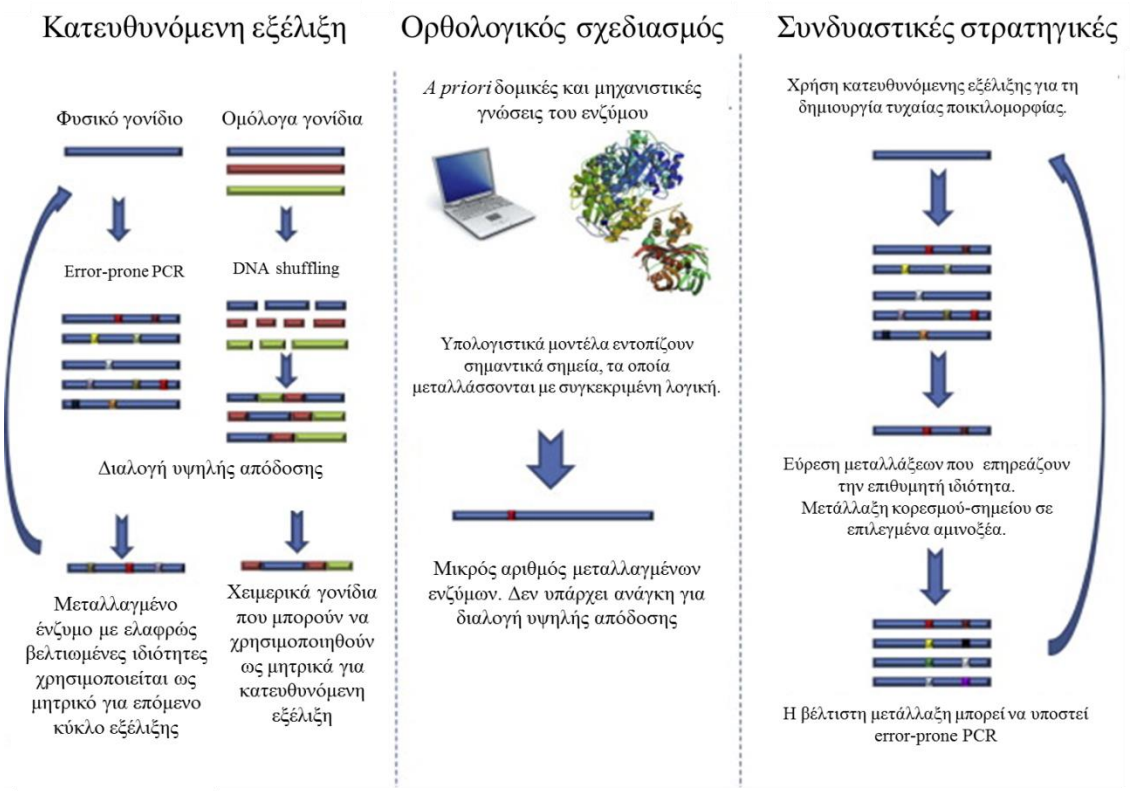
2.2 Πρωτεϊνική Μηχανική

Αρχίζοντας στα τέλη της δεκαετίας του 1970, με το πρωτοποριακό έργο του Michael Smith το οποίο αργότερα ενισχύθηκε με τις συνεισφορές των Pim Stemmer και Frances Arnold, οι μικροβιολόγοι άρχισαν να αναπτύσσουν τεχνικές που επέτρεπαν την κατευθυνόμενη εξέλιξη των ενζύμων. Αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή τροποποιημένων ή προσαρμοσμένων ενζύμων που είναι σχεδιασμένα να δρουν σε μη φυσικά υποστρώματα και σε συνθήκες αντίδρασης πολύ απομακρυσμένες από αυτές που επικρατούν στα φυσικά συστήματα. Σε μια πρωταρχική δημοσίευση του 1993 από την Frances Arnold, για παράδειγμα, αποδείχθηκε ότι η σουμπτιλισίνη Ε θα μπορούσε να μετασχηματιστεί μέσω διαδοχικών γύρων τυχαίας μεταλλαξιγένεσης ώστε να είναι όλο και περισσότερο ανεκτική σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) ως οργανικό συνδιαλύτη, καταλήγοντας έτσι σε ένα μετάλλαγμα το οποίο είναι 256 φορές πιο δραστικό σε

65% DMF έναντι του φυσικού ενζύμου (Chen and Arnold, 1993). Για την έρευνα της Frances Arnold όλα αυτά τα χρόνια και τη συνδρομή της στην κατευθυνόμενη εξέλιξη της απονεμήθηκε Βραβείο Νόμπελ Χημείας για το 2018.

Εκτός από την αντιμετώπιση ελλείψεων σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες που παρατηρούνται συνήθως στα φυσικά ένζυμα, διάφορες τεχνικές γενετικής μηχανικής έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της αποδοχής των μη φυσικών υποστρωμάτων, για την αλλαγή της στερεοεκλεκτικότητας, για την αντιμετώπιση ζητημάτων αναστολής υποστρώματος, προϊόντος ή συμπαράγοντα και για τη βελτίωση της θερμικής σταθερότητας ή της σταθερότητας σε pH. Η ευρεία υιοθέτηση της σύγχρονης τεχνολογίας πρωτεϊνών έχει οδηγήσει σε μια σειρά αξιόλογων εφαρμογών. Υποστρώματα τα οποία είναι τελείως διαφορετικά από τα φυσικά είναι τώρα ικανά να μετασχηματιστούν από ένζυμα με αποτελεσματικότητες κατάλληλες για βιομηχανικές εφαρμογές (Hughes and Lewis, 2018).

Ο σχεδιασμός της μηχανικής των ενζύμων και η κατασκευή καινοτόμων πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω χειρισμού γονιδίων, χρησιμοποιώντας τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA. Η μηχανική των ενζύμων αποτελείται από τρεις στρατηγικές: κατευθυνόμενη εξέλιξη (directed evolution), ορθολογικός σχεδιασμός (rational design), και ημιορθολογικός σχεδιασμός (semi-rational design) μέσω μεταλλαξιγένεσης κορεσμού σημείου (site saturation mutagenesis). Ο ημιορθολογικός σχεδιασμός είναι ένας συνδυασμός του ορθολογικού σχεδιασμού και της κατευθυνόμενης εξέλιξης (Dubey et al., 2019). Η επιλογή της μεθόδου μηχανικής ενζύμου συνήθως εξαρτάται από τις διαθέσιμες γνώσεις σχετικά με το προς εξέταση ένζυμο. Αν αυτές είναι λίγες, τότε η κατευθυνόμενη εξέλιξη είναι η προτεινόμενη επιλογή αρκεί να υπάρχει διαθέσιμη μέθοδος διαλογής υψηλής απόδοσης. Αν η αλληλουχία και η δομή της πρωτεΐνης είναι διαθέσιμες, τότε προτιμώνται ο ορθολογικός ή ημιορθολογικός σχεδιασμός, ο οποίος απαιτεί και λιγότερο υψηλής απόδοσης μεθόδους διαλογής. Οι στρατηγικές αυτές συνοψίζονται στην Εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.2 Στρατηγικές πρωτεϊνικής μηχανικής για βελτίωση των ιδιοτήτων ενζύμων.

2.2.1 Κατευθυνόμενη εξέλιξη (Directed Evolution)

Ο «παράλογος» σχεδιασμός, επίσης γνωστός ως κατευθυνόμενη εξέλιξη, προσομοιώνει τη φυσική εξέλιξη με την εισαγωγή τυχαίων μεταλλάξεων *in vivo* ή *in vitro* στα γονίδια ή με γενετικό ανασυνδυασμό *in vitro*. Υπό συνθήκες που δεν είναι ξεκάθαρες για τη δομή και τον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου, οι μεταλλάξεις αυτές προσδίδουν τελικά μερικά εξαιρετικά χαρακτηριστικά στα μόρια των ενζύμων. Έχει αναφερθεί ότι μικρές μεταβολές σε ορισμένα αμινοξέα της αμινοξικής ακολουθίας του ενζύμου, τα οποία μπορεί να μην έχουν άμεσα σχέση με τα καταλυτικά αμινοξέα, μπορούν να μεταβάλλουν σημαντικά την καταλυτική ικανότητα του ενζύμου, τη στερεοεκλεκτικότητα, τις βέλτιστες συνθήκες δράσης ή τη σταθερότητα του (Deng et al., 2019).

Η εξελικτική μέθοδος είναι η πλέον αποτελεσματική μέθοδος ενζυμικής μηχανικής, ιδιαίτερα όταν τα δεδομένα σχετικά για το μηχανισμό δράσης της πρωτεΐνης-στόχου είναι πεπερασμένα. Η κατευθυνόμενη εξέλιξη εκμεταλλεύεται μια επιρρεπή σε σφάλματα PCR (error-prone PCR) για να δημιουργήσει μια

βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων γονιδίων. Για να αυξηθεί η επίδραση μιας αρχικής ευεργετικής μετάλλαξης, απαιτούνται πολλαπλοί κύκλοι μεταλλάξεων. Επί του παρόντος, ο *in vitro* ανασυνδυασμός ή η ανακατασκευή (shuffling) του DNA παίζουν σημαντικό ρόλο στη βελτίωση της κατευθυνόμενης εξέλιξης (Dubey et al., 2019).

Η μέθοδος της κατευθυνόμενης εξέλιξης περιλαμβάνει τρία σημαντικά βήματα: την κατασκευή μιας πλούσιας βιβλιοθήκης των μεταλλαγμένων ενζύμων που να περιλαμβάνει ποικίλες μεταλλάξεις σε διαφορετικά σημεία, την επιλογή του σωστού ξενιστή στον οποίο θα εκφραστούν λειτουργικά τα μέλη της παραγόμενης βιβλιοθήκης και την εδραίωση μιας γρήγορης και αποδοτικής τεχνικής διαλογής (high-throughput screening) βασισμένης στην ιδιότητα (ή τις ιδιότητες) του ενζύμου που θέλουν βελτίωση (Deng et al., 2019).

2.2.2 Ορθολογικός σχεδιασμός (Rational design)

Η ορθολογική μέθοδος σχεδιασμού είναι η πιο σημαντική μέθοδος της πρωτεϊνικής μηχανικής που βασίζεται στην "τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση" (site-directed mutagenesis) των πρωτεϊνών. Η τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση βασίζεται στην αρχή της αντικατάστασης των αυθεντικών αμινοξέων σε μία πρωτεΐνη-στόχο με άλλα. Η προσέγγιση του ορθολογικού σχεδιασμού τίθεται σε εφαρμογή όταν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τη βασική δομή, τη λειτουργία και τον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου αυτού. Η τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο των βιοχημικών και καταλυτικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών και είναι μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες στρατηγικές για τη μοριακή τροποποίηση των ενζύμων. Η επιλογή και η ταυτοποίηση της θέσης μετάλλαξης είναι το πιο σημαντικό βήμα στην διαδικασία αυτή. Η εξέταση της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου μπορεί να είναι χρήσιμη για την ταυτοποίηση μιας θέσης μετάλλαξης. Αυτή η διεργασία ενισχύει την καταλυτική δραστικότητα, την εξειδίκευση, τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα του ενζύμου. Η πρόβλεψη της δομής του ενζύμου με βάση τη βιοπληροφορική ή η γνώση της πραγματικής

δομής του είναι ουσιώδης για τη μεταλλαξιγένεση που επικεντρώνεται σε ένα ή σε πολλαπλά σημεία (Dubey et al., 2019).

Η τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση έχει έντονο χαρακτήρα σκοπιμότητας και δεν απαιτεί μεγάλο κόπο στην διαλογή των παραγόμενων μεταλλαγμένων ενζύμων. Παρόλα αυτά, η προηγηθείσα ανάλυση και μελέτη είναι πολύ σημαντικές. Συχνά πρέπει να αποκτηθεί μεγάλος όγκος γνώσης σχετικά με το ένζυμο και τον τρόπο δράσης του, ο οποίος αποκτάται κυρίως από προηγούμενες μελέτες. Αν το σχεδιαζόμενο σημείο για μετάλλαξη, δεν είναι κατάλληλο, τότε η επίδραση όχι μόνο δε θα είναι θετική, αλλά μπορεί να είναι και αρνητική (Deng et al., 2019).

Ιδανικά, για την εφαρμογή της στρατηγικής του ορθολογικού σχεδιασμού απαιτείται η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης. Παρόλο που με την πρόοδο της κρυσταλλογραφίας μακρομορίων, λύνονται ολοένα και περισσότερες δομές, αυτό δεν είναι πάντα εφικτό. Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη προγραμμάτων προσομοίωσης σε υπολογιστή μπορεί και καλύπτει εν μέρει αυτό το κενό. Στη μελέτη πρωτεϊνών-στόχων χωρίς γνωστή δομή, μπορεί να γίνει κατασκευή τρισδιάστατων μοντέλων που την προσομοιάζουν (Deng et al., 2019). Επιπρόσθετα, με τη χρήση προγραμμάτων μελέτης της πρόσδεσης υποστρωμάτων στη δομή μιας πρωτεΐνης (docking), μπορεί να παρακαμφθεί η ανάγκη για πειραματικά δεδομένα προσδεδεμένων υποστρωμάτων σε κρυσταλλικές δομές που είναι δύσκολο να ληφθούν.

2.2.3 Ημιορθολογικός σχεδιασμός (Semi-rational design)

Ο ημιορθολογικός σχεδιασμός είναι μια μέθοδος μοριακής τροποποίησης ενζύμων που συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της κατευθυνόμενης εξέλιξης και του ορθολογικού σχεδιασμού. Ο μελετητικός σχεδιασμός της δομής και της λειτουργίας του ενζύμου απαιτεί περιορισμένη κατανόηση των ενζύμων και επικεντρώνεται σε ένα μικρό αριθμό καταλοίπων. Πραγματοποιείται η χρήση βιοπληροφορικών μεθόδων για την ανάλυση μιας μεγάλης ποσότητας πληροφοριών ευθυγράμμισης πρωτεϊνών, δευτεροταγούς δομής ή μοντελοποίησης

τρισδιάστατης διαμόρφωσης της πρωτεΐνης-στόχου και στη συνέχεια αυτή τροποποιείται πιο συγκεκριμένα.

Συγκρινόμενη με την κατευθυνόμενη εξέλιξη η μέθοδος αυτή έχει κυρίως δύο πλεονεκτήματα. Το ένα είναι ότι η προκύπτουσα βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων γονιδίων είναι πολύ μικρότερη, καθώς είναι στενά σχετιζόμενη με τον προκαθορισμένο στόχο. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η μέθοδος διαλογής δεν χρειάζεται να είναι υψηλής απόδοσης και είναι ευκολότερο να αποκτηθεί ένα θετικό αποτέλεσμα μετάλλαξης. Στον ημιορθολογικό σχεδιασμό μπορεί το σημείο της μετάλλαξης να είναι συγκεκριμένο, αλλά η επιλογή του αμινοξέος που θα το αντικαταστήσει δεν είναι. Έτσι, εκτός από τυχαίες μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες θέσεις, μπορεί να πραγματοποιηθούν και μεταλλάξεις κορεσμού σημείου (point-saturation mutagenesis). Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει μια μελέτη σύγκρισης της σχέσης μεταξύ της φύσης του αμινοξέος και της επίδρασης που έχει στη λειτουργία του ενζύμου (Deng et al., 2019).

2.3 Οικογένειες μελετώμενων ενζύμων

Στις επόμενες παραγράφους παρατίθενται κάποιες βασικές πληροφορίες σχετικά με τις διαφορετικές ενζυμικές ενεργότητες που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή και οι οποίες σχετίζονται με την αποικοδόμηση αρωματικών ρύπων.

2.3.1 Λακκάσες

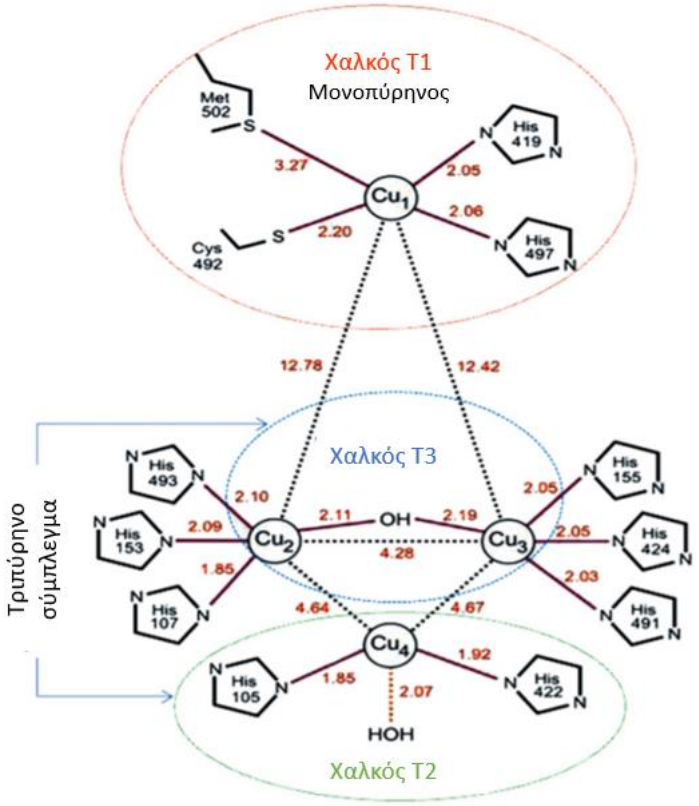
Οι λακκάσες (benzenediol: oxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2) είναι πολυφαινολικές οξειδάσες που περιέχουν πολλαπλούς χαλκούς στο ενεργό τους κέντρο (Chaurasia et al., 2013) και παράγονται κατά τη διάρκεια του δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων σε φυσικά υποστρώματα ή καλλιέργειες (Gayazov and Rodakiewicz-Nowak, 1996).

Έχουν λάβει μεγάλη προσοχή από τους ερευνητές λόγω της ικανότητάς τους να απομακρύνουν μια ποικιλία έμμονων ρύπων. Ενώσεις οι οποίες είναι δομικά παρόμοιες με την λιγνίνη μπορούν να οξειδωθούν από μυκητιακές λακκάσες. Όλες είναι μέλη της οικογένειας των οξειδασών που φέρουν πολλαπλά ιόντα

χαλκού (multi-copper oxidases, MCOs). Οι MCOs τυπικά περιέχουν δύο ή τέσσερα άτομα χαλκού ανά πρωτεϊνικό μόριο και καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης. Σε αυτές τις αντιδράσεις, τα ηλεκτρόνια απομακρύνονται από τα αναγωγικά μόρια υποστρώματος και μεταφέρονται στο οξυγόνο για να σχηματίσουν νερό (Upadhyay et al., 2016). Οι λακκάσες συνεπώς χρησιμοποιούν το ατμοσφαιρικό οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων αντί του υπεροξειδίου του υδρογόνου που χρησιμοποιείται από τις υπεροξειδάσες, γεγονός που τις καθιστά ελκυστικές για ποικίλες βιομηχανικές εφαρμογές (Nunes and Kunamneni, 2018) αλλά και ανενεργές υπό αναερόβιες συνθήκες (Osman and Cavet, 2008).

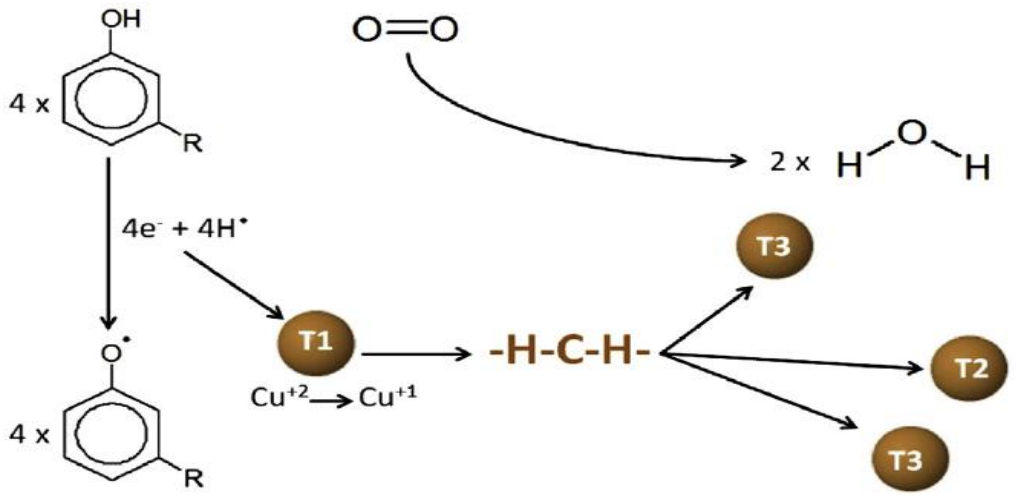
Η καταλυτική δράση των οξειδασών του χαλκού διασφαλίζεται από την παρουσία διαφορετικών κέντρων χαλκού στο μόριο του ενζύμου. Συγκεκριμένα χαρακτηρίζονται από την παρουσία τουλάχιστον ενός χαλκού τύπου I (T1), μαζί με τουλάχιστον τρία επιπρόσθετα ιόντα χαλκού, ένα τύπου II (T2) και δύο τύπου III (T3) τα οποία δομούν ένα τριπύρηνο σύμπλεγμα (Εικόνα 2.3). Τα διαφορετικά κέντρα χαλκού μπορούν να αναγνωριστούν με βάση τις φασματοσκοπικές τους ιδιότητες.

Ο χαλκός T1 απορροφά έντονα στα 600 nm και μεταδίδει το μπλε χρώμα, ο χαλκός T2 είναι αόρατος στο φάσμα απορρόφησης ενώ τα δύο άτομα χαλκού T3 απορροφούν έντονα στα 330 nm (Santhanam et al., 2011). Ένζυμα που στερούνται το άτομο χαλκού T1 και άρα και το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα ονομάζονται «κίτρινες» ή «λευκές» λακκάσες, αλλά αρκετοί συγγραφείς δεν τις κατατάσσουν στις λακκάσες (Baldrian, 2006).



Εικόνα 2.3 Τα ενεργά κέντρα της λακκάσης CotA του *Bacillus subtilis* (Dwivedi et al., 2011)

Ο χαλκός T1 έχει ένα τριγωνικό συντονισμό, με δύο ιστιδίνες, μια κυστεΐνη και μία αξονική θέση συνήθως μεταβλητή. Ο χαλκός T2 δεν εμφανίζει απορρόφηση στο ορατό φάσμα και φανερώνει παραμαγνητικές ιδιότητες στις μελέτες παραμαγνητικού συντονισμού ηλεκτρονίων (Electron paramagnetic resonance – EPR). Είναι στρατηγικά τοποθετημένος κοντά στους χαλκούς T3, ένα διπυρηνικό κέντρο που χαρακτηρίζεται φασματοσκοπικά από προσρόφηση ηλεκτρονίων στα 330 nm (οξειδωμένη μορφή) και από την απουσία σήματος EPR ως αποτέλεσμα της παραμαγνητικής σύζευξης του ζεύγους χαλκού. Ο χαλκός T3 είναι επίσης το κοινό χαρακτηριστικό της άλλης υπεροικογένειας πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις τυροσινάσες. Ο χαλκός T2 συντονίζεται με δύο και ο T3 με έξι ιστιδίνες. Η ισχυρή παραμαγνητική σύζευξη μεταξύ των δύο τύπων χαλκού διατηρείται με μια γέφυρα υδροξυλίου (Claus, 2004) όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.4.



Εικόνα 2.4 Ο κύκλος κατάλυσης της λακκάσης. Το υπόστρωμα οξειδώνεται από το χαλκό T1 και τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω ενός εξαιρετικά διατηρημένου τριπεπτιδίου HIS-Cys-His στους χαλκούς T2 και T3. Εκεί λαμβάνει χώρα η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. (Rivera-Hoyos et al., 2013)

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

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

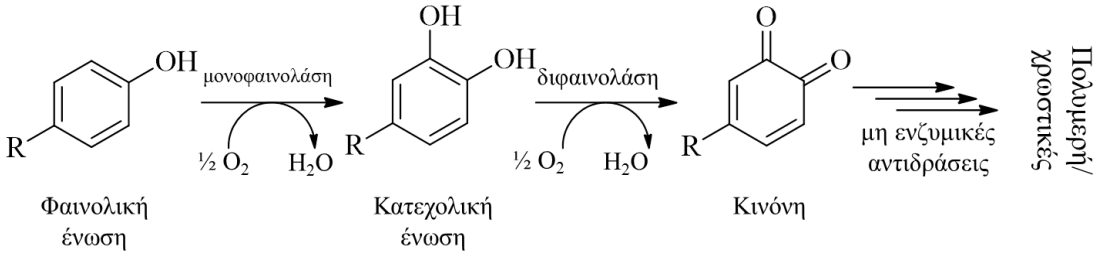
Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι λακκάσες είναι από τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται σε διεργασίες απολιγνινοποίησης από μύκητες λευκής σήψης (Riva, 2006) αλλά και στην ανάπτυξη και τη μορφογένεση των μυκήτων (Morozova et

al., 2007). Επιπρόσθετα, αυτά τα ένζυμα μπορούν να προστατεύσουν τους παθογόνους μύκητες από τις τοξικές φυτοαλεξίνες και τανίνες, επομένως αποτελούν σημαντικό παράγοντα της παθογόνου δράσης πολλών μυκητιακών ασθενειών (Mayer and Staples, 2002).

Τα ένζυμα της οικογενείας αυτής έχουν εφαρμοστεί σε πολλές και διαφορετικές εφαρμογές μεταξύ αυτών και η βιοεξυγίανση. Πιο συγκεκριμένα, οι λακκάσες έχουν τη δυνατότητα να αποχρωματίζουν βαφές και να οξειδώνουν PAHs, χλωροφαινόλες, νιτροφαινόλες και άλλα είδη αρωματικών και χλωριωμένων ενώσεων (Varjani, 2016).

2.3.2 Πολυφαινολοξειδάσες

Οι πολυφαινολοξειδάσες (polyphenol oxidases – PPOs) περιλαμβάνουν δύο κατηγορίες ενζυμικών ενεργοτήτων, την τυροσινάση (L-tyrosine, L-dopa:oxygen oxidoreductase; EC 1.14.18.1) και την κατεχολοξειδάση (1,2-benzenediol:oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.1), οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών χαλκού Τύπου ΙΙΙ. Το κέντρο χαλκού Τύπου ΙΙΙ αποτελείται από δύο ιόντα χαλκού (CuA και CuB) τα οποία συντονίζονται από τρία κατάλοιπα ιστιδίνης το καθένα (Kanteev et al., 2015). Η διάκριση μεταξύ τυροσινασών και κατεχολοξειδασών πιστευόταν ότι έγκειται στη δυνατότητά τους να υδροξυλιώνουν φαινόλες στην *όρθο*- θέση (ενεργότητα μονοφαινολάσης) και πιο συγκεκριμένα την τυροσίνη, η οποία θεωρείται το φυσικό υπόστρωμά τους. Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες στο αντικείμενο έχουν δείξει ότι η δυνατότητα της υδροξυλίωσης δε συσχετίζεται απαραίτητα με το υπόστρωμα της τυροσίνης και ότι είναι μια γενική δράση των PPO (Molitor et al., 2016).



Εικόνα 2.5 Δράση των πολυφαινολοξειδασών. Υδροξυλίωση φαινολικών υποστρωμάτων και σύνθεση κατεχολικών. Περαιτέρω οξείδωση αυτών σε κινόνες που υφίστανται μη ενζυμικές αντιδράσεις.

Οι PPO μπορούν να εντοπιστούν σε όλα τα είδη των οργανισμών, από τα βακτήρια μέχρι τους ανθρώπους και ο βασικός ρόλος τους είναι ο σχηματισμός μελανίνης και άλλων φαινολικών πολυμερών, τα οποία συνήθως έχουν προστατευτικό ρόλο (Agarwal et al., 2014). Στα φυτά και τα μανιτάρια (Βασιδιομύκητες), οι PPO έχουν μελετηθεί εκτενώς, λόγω του μαυρίσματος που δημιουργούν ύστερα από τη συλλογή τους, το οποίο μειώνει την αξία των προϊόντων (Agarwal et al., 2014; Sullivan, 2015). Οι φυτικές PPO έχει επίσης βρεθεί ότι παίρνουν μέρος στο δευτερογενή μεταβολισμό για τη σύνθεση πολυφαινολών (Sullivan, 2015). Επιπρόσθετα, η δράση τους έχει σχετιστεί με αντοχή σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Constabel and Barbehenn, 2008). Από την άλλη, οι βακτηριακές τυροσινάσες είναι είτε εξωκυτταρικές (στελέχη *Streptomyces* και *Bacillus*), είτε εσωκυτταρικές (*Marinomonas mediterranea*) και επάγονται με τη θερμότητα ή την παρουσία τυροσίνης (Agarwal et al., 2014; Solano, 2014).

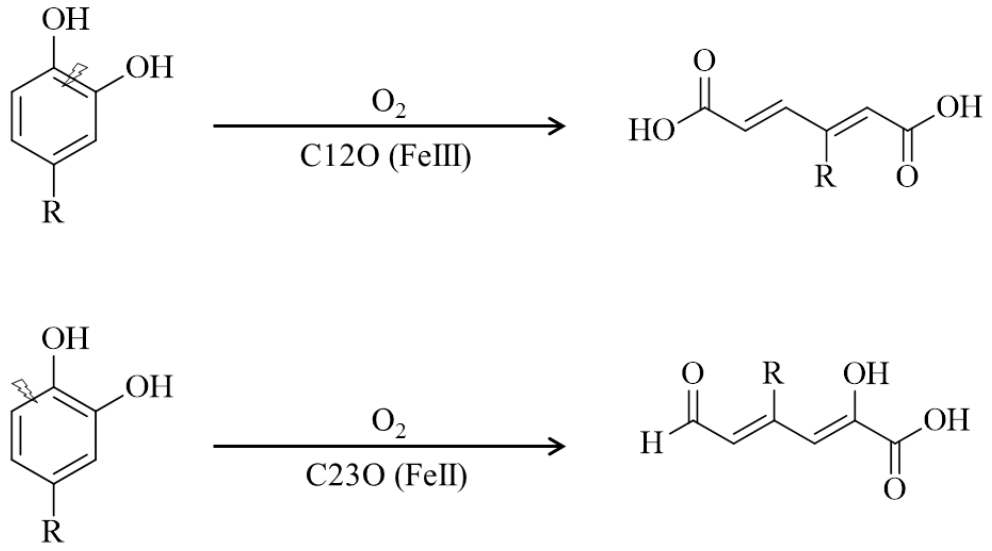
Παρότι το μεταβολικό μονοπάτι για την παραγωγή μελανίνης στους βασιδιομύκητες είναι παρόμοιο με αυτό στα ζώα, η μελανογένεση στους ασκομύκητες συνδέεται με συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης του μύκητα και λαμβάνει χώρα στο κυτταρικό τοίχωμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, πρόδρομες ενώσεις μελανίνης (υδροξυλιωμένο ναφθαλένιο και όχι τυροσίνη), εκκρίνονται από το μύκητα και οξειδώνονται εξωκυτταρικά. Η μελανίνη λειτουργεί ως προστατευτικός παράγοντας ενάντια στην ακτινοβολία, τη θερμοκρασία, τις ελεύθερες ρίζες και τους παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά

επίσης μπορεί να δράσει και σαν μολυσματικός παράγοντας των μυκήτων ενάντια στους ξενιστές τους (Solano, 2014).

Μηχανιστικές και δομικές μελέτες των τυροσινασών είναι σημαντικές για την ανάπτυξη εν δυνάμει παρεμποδιστών για χρήση σε ασθένειες που σχετίζονται με υπέρχρωση στον άνθρωπο (Buitrago et al., 2016). Εκτός αυτού, οι PPO έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοκαταλύτες σε πολλές αντιδράσεις με εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών ενώσεων και καλλυντικών (Faccio et al., 2012; Isaschar-Ovdat and Fishman, 2018) και επίσης ως βιοαισθητήρες για την ανίχνευση μικροποσοτήτων φαινολικών σε μολυσμένα νερά (Gul et al., 2017). Επιπροσθέτως, έχουν δείξει προοπτική για τη βιοεξυγίανση αποβλήτων που περιέχουν φαινολικές ενώσεις και για τη μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (Edalli et al., 2016; Faccio et al., 2012; Mukherjee et al., 2013). Όπως αναφέρθηκε πρόσφατα, παρόλο που οι λακκάσες έχουν μελετηθεί αρκετά σχετικά με την εφαρμογή τους στη βιοεξυγίανση, οι PPO παραμένουν ανεξερεύνητες (Ba and Vinoth Kumar, 2017).

2.3.3 Διοξυγενάσες της κατεχόλης

Η διάνοιξη του δακτυλίου είναι πολύ σημαντικό βήμα για την αποικοδόμηση των αρωματικών ουσιών, η οποία ξεκινά με τη διπλή υδροξυλίωσή τους (Arora et al., 2010). Τα κατεχολικά προϊόντα που προκύπτουν (κατεχόλη, προτοκατεχουικό ή υδροξυκινόλη) μετασχηματίζονται από διοξυγενάσες διάνοιξης δακτυλίου. Το σπάσιμο του δακτυλίου πραγματοποιείται με την εισαγωγή δύο ατόμων οξυγόνου προερχόμενα από μοριακό οξυγόνο. Η εισαγωγή αυτή γίνεται είτε ανάμεσα (*ορθο*-σπάσιμο) είτε δίπλα (*μετα*- σπάσιμο) στα κατεχολικά υδροξύλια. Οι διοξυγενάσες ενδοδιόλης (intradiol dioxygenases) που ανήκουν στο ο*ρθο*- μεταβολικό μονοπάτι περιέχουν ένα ιόν σιδήρου III (Fe^{3+}), ενώ οι διοξυγενάσες εξωδιόλης (extradiol dioxygenases) ανήκουν στο *μέτα*- μεταβολικό μονοπάτι και περιέχουν ένα ιόν σιδήρου II (Fe^{2+}) στο ενεργό τους κέντρο (Siegbahn and Haeffner, 2004). Οι διοξυγενάσες εξωδιόλης περιλαμβάνουν και τις διοξυγενάσες τύπου κουπίνης, οι οποίες δρουν σε μη κατεχολικά αρωματικά καρβοξυλικά οξέα (γεντισικό, σαλικυλικό, υδρόξυ-ναφθοϊκό ή αμινουδρόξυ βενζολικό) (Fetzner, 2012).



Εικόνα 2.6 Προϊόντα διάσπασης κατεχολικού δακτυλίου από 1,2-διοξυγενάση της κατεχόλης (C12O) και 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης (C23O).

Υπάρχουν δύο είδη διοξυγενασών της κατεχόλης. Η 1,2-διοξυγενάση της κατεχόλης (C12O) και η 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης (C23O), οι οποίες μπορούν να διακριθούν με βάση τα προϊόντα που δίνουν και τους συμπαράγοντές τους. Η C12O χρησιμοποιεί Fe^{3+} ως συμπαράγοντα για να διασπάσει το δεσμό άνθρακα-άνθρακα μεταξύ των φαινολικών υδροξυλομάδων της κατεχόλης, αποδίδοντας ως προϊόν το *cis,cis*-μουκονικό οξύ (muconic acid) όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.6. Αντίθετα, η C23O χρησιμοποιεί το Fe^{2+} ως συμπαράγοντα για να διασπάσει τον δεσμό άνθρακα-άνθρακα που βρίσκεται δίπλα στις υδροξυλομάδες της κατεχόλης, δίνοντας ως προϊόν την 2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΰδη (2-hydroxymuconic semialdehyde), όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2.6 (Gibson and Parales, 2000; Solomon et al., 2000). Κάθε ένα από αυτά τα ένζυμα μπορεί να έχει ιδιαίτερη προτίμηση στους υποκαταστάτες του κατεχολικού δακτυλίου.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Χλωριωμένοι αρωματικοί ρύποι

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η αποτοξικοποίηση χλωριωμένων αρωματικών ρύπων. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι 2-, 3-, 4,-χλωροφαινόλες (CP) και οι 2,4-, 2,5-, 3,5-διχλωροφαινόλες (DCP). Επίσης μελετήθηκε μια ένωση της κατηγορίας των PCB και πιο συγκεκριμένα το 2,4,5-τριχλωροδιφαινύλιο (PCB29). Όλες οι παραπάνω προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α).

3.2 Θαλάσσιοι μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν δύο βιβλιοθήκες μικροοργανισμών οι οποίοι είχαν απομονωθεί ως συμβιώτες θαλάσσιων ασπόνδυλων (πχ σπόγγοι, μαλακά κοράλλια, ανεμώνες, εχινόδερμα) από διαφορετικές περιοχές του κόσμου (ανατολική και δυτική Μεσόγειος Θάλασσα, Θάλασσα Ανταμάν στον ανατολικό Ινδικό Ωκεανό και Ερυθρά Θάλασσα). Η συλλογή των ασπόνδυλων πραγματοποιήθηκε για τη δυτική Μεσόγειο από την εταιρία iMARE (Γρανάδα, Ισπανία), για τη Θάλασσα Ανταμάν από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Chulalongkorn (Μπανγκόκ, Ταϋλάνδη) και για την ανατολική Μεσόγειο και την Ερυθρά Θάλασσα από το Τμήμα Ζωολογίας του Πανεπιστημίου του Τελ Αβίβ (Ισραήλ). Η απομόνωση των συμβιοτικών μικροοργανισμών από τα θαλάσσια ασπόνδυλα πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Χημείας Φυσικών Προϊόντων του CNRS στη Γαλλία. Η συλλογή και απομόνωση πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος TASCMAR (Horizon 2020, grant agreement no. 634674).

Με αυτόν τον τρόπο κατασκευάστηκαν δύο βιβλιοθήκες μικροοργανισμών: η TARMIC που αποτελείται από 60 μυκητιακά στελέχη (κυρίως ασκομύκητες), τα οποία απομονώθηκαν αποκλειστικά από ασπόνδυλα της μεσόφωτης θαλάσσιας ζώνης, ενώ η βιβλιοθήκη MICLIB που αποτελείται από 44 μυκητιακά στελέχη, 20

από τα οποία προέρχονται από την άνω μεσόφωτη ζώνη, ενώ τα υπόλοιπα από ρηχούς υφάλους.

3.3 Μέθοδοι καλλιέργειας θαλάσσιων μικροοργανισμών

Για την ανάπτυξη των μυκητιακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το προπαρασκευασμένο εμπορικό θρεπτικό μέσο Marine Broth (Dehydrated Culture Media) for microbiology της εταιρίας Panreac AppliChem (Γερμανία), χωρίς την προσθήκη άλλης πηγής άνθρακα. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού σε g/L ήταν η ακόλουθη: βορικό οξύ 0,022, νιτρικό άλας αμμωνίου 0.0016, χλωριούχο ασβέστιο 1,8, χλωριούχο στρόντιο 0,034. εκχύλισμα ζύμης 1, κιτρικό σίδηρο 0,1, χλωριούχο μαγνήσιο 8,8, βακτηριολογική πεπτόνη 5, βρωμιούχο κάλιο 0,08, χλωριούχο κάλιο 0,55, χλωριούχο νάτριο 19,4, φθοριούχο νάτριο 0,0024, όξινο ανθρακικό νάτριο 0,16, όξινο φωσφορικό δινάτριο 0,008, πυριτικό νάτριο 0,004, θειικό νάτριο 3,24. Στην περίπτωση παρασκευής θρεπτικού για τρυβλία, γινόταν προσθήκη 15 g/L άγαρ.

Εμβολιασμένα με μύκητα τρυβλία που είχαν αφεθεί να μεγαλώσουν 5 ημέρες στους 27 ^{o}C, χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία στοκ γλυκερόλης, με σκοπό τη μακροχρόνια διατήρηση των στελεχών. Τα μικκύλια και τα σπόρια από τα τρυβλία αιωρήθηκαν σε 1 mL διαλύματος PBS με 10% γλυκερόλη και αποθηκεύτηκαν στους -80 ^{o}C.

Πριν την καλλιέργειά τους, γινόταν αναβίωση των στελεχών σε τρυβλία από στοκ γλυκερόλης (-80 ^{o}C) με επώασή τους στους 27 ^{o}C για 5 ημέρες. Μέρος της ανεπτυγμένης βιομάζας χρησιμοποιούταν για εμβολιασμό υγρού θρεπτικού μέσου και η επώαση πραγματοποιούταν στους 27 ^{o}C υπό ανάδευση 160 rpm για όσο χρόνο ήταν απαραίτητος στο κάθε πείραμα.

3.4 Διαλογή θαλάσσιων μικροοργανισμών για τη δυνατότητά τους να απομακρύνουν χλωριωμένους οργανικούς ρύπους

Η διαλογή των μικροοργανισμών έγινε με τη μέθοδο των κυττάρων σε ηρεμία ή αλλιώς μη-αναπτυσσόμενων κυττάρων (resting-cells reaction). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή τα διάφορα μυκητιακά στελέχη αναπτύσσονταν σε υγρό θρεπτικό μέσο στις συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω για 5 ημέρες. Στη συνέχεια, η νωπή βιομάζα που προέκυπτε από φιλτράρισμα διαμέσου φίλτρου διαμέτρου 0,2 μm ξεπλύθηκε και ύστερα προσετέθη σε υπερκάθαρο νερό που περιείχε διαλυμένο τον αντίστοιχο ρύπο. Στην περίπτωση της 2,4-DCP, η συγκέντρωση ήταν 1 mM, ενώ στην περίπτωση του λιπόφιλου PCB29, χρησιμοποιήθηκε κορεσμένο στην ένωση διάλυμα (συγκέντρωση περίπου 1 μM).

Οι αντιδράσεις αφέθηκαν για επώαση για 10 ημέρες στους 27 ^{o}C υπό ελαφριά ανάδευση. Δείγματα λαμβάνονταν την 3^{η}, 6^{η} και 10^{η} ημέρα επώασης και αναλύθηκαν σύμφωνα με τις παρακάτω μεθόδους.

3.5 Αναλυτικές Τεχνικές

3.5.1 Υγρή χρωματογραφία (HPLC-DAD)

Τα δείγματα που ελήφθησαν από τις αντιδράσεις με τη 2,4-DCP αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία. Τα δύο πρώτα δείγματα αναλύθηκαν ύστερα από φιλτράρισμα για απομάκρυνση της βιομάζας. Τη 10^{η} ημέρα ο συνολικός όγκος της αντίδρασης εκχυλίστηκε με ίσο όγκο χλωροφορμίου. Μία ποσότητα του εκχυλίσματος εξατμίστηκε και επαναιωρήθηκε σε ίσο όγκο νερού πριν την ανάλυση.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή HPLC SHIMADZU LC-20AD εξοπλισμένη με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20A. Η στατική φάση ήταν μία στήλη NUCLEOSIL® 100-5 αντίστροφης φάσης C-18 και η κινητή φάση ήταν 40% (v/v) ακετονιτρίλιο σε νερό με ροή 0,8 mL min^{-1}. Η ανίχνευση της DCP πραγματοποιήθηκε με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (photodiode array) Varian ProStar στα 285 nm και ο χρόνος ανάσχεσης ήταν περίπου 11 λεπτά.

3.5.2 Αέρια χρωματογραφία (GC-ECD)

Τα δείγματα από τις αντιδράσεις διαλογής του PCB29 εκχυλίστηκαν με ίσο όγκο οξικού αιθυλεστέρα πριν από την ανάλυση τους στην συσκευή αέριας χρωματογραφίας SHIMADZU GC-17A με ενσωματωμένη τριχοειδή στήλη Equity®-5 (30 m). Η κινητή φάση ήταν αέριο ήλιο με ρυθμό ροής 1,8 mL min^{-1}. Δείγματα 1 μL εγχύθηκαν με ή/και χωρίς διαχωρισμό ροής (split/splitless mode) και η θυρίδα έγχυσης διατηρήθηκε στους 280 ^{o}C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το εξής: (i) 90 ^{o}C για 3 min, (ii) αύξηση στους 220 ^{o}C με ρυθμό 30 ^{o}C min^{-1} και διατήρηση σε αυτή τη θερμοκρασία για 1 min, (iii) αύξηση στους 280 ^{o}C με ρυθμό 25 ^{o}C min^{-1} και διατήρηση σε αυτή τη θερμοκρασία για 2 min.

Η ανίχνευση διεξήχθη με ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων ECD-17 με δραστικότητα 10 mCi, διατηρούμενο στους 300 ^{o}C. Ο χρόνος ανάσχεσης του PCB29 ήταν περίπου 10,35 min, ενώ η αρχική συγκέντρωση του στο κορεσμένο διάλυμα υπολογίστηκε ίση με 0,97 μM (0,25 ppm).

3.6 Ανάλυση μεταβολιτών

Οι αντιδράσεις των μικροοργανισμών με τη μεγαλύτερη δυνατότητα απομάκρυνσης των ρύπων, μελετήθηκαν για την ταυτοποίηση μεταβολιτών που μπορεί να προέρχονται από τον μετασχηματισμό ή την αποδόμηση των αρχικών ενώσεων.

3.6.1 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με αναλυτή μάζας (UHPLC-MS)

Η ανάλυση των αντιδράσεων που προέρχονταν από τους μικροοργανισμούς της βιβλιοθήκης MICLIB πραγματοποιήθηκε σε ένα φασματόμετρο μάζας ESI-LTQ-Orbitrap Discovery XL της Thermo Scientific συνδεδεμένο με ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας Accela UHPLC της Thermo Scientific. Ο αναλυτής Orbitrap είναι από τους πιο πρόσφατους, τελευταίας τεχνολογίας αναλυτής μαζών και λειτουργεί παγιδεύοντας ιόντα σε κυκλική κίνηση. Αποτελείται από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο με σχήμα ατράκτου και ένα εξωτερικό κυλινδρικό

ηλεκτρόδιο, ομοαξονικό με το κεντρικό ηλεκτρόδιο. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης Fortis UPLC C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μm) της Fortis Technologies Ltd. Η κινητή φάση αποτελούταν από 0,1% (ν/ν) μυρμηκικό οξύ/νερό (διαλύτης Α) και ακετονιτρίλιο (διαλύτης Β). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μέθοδος σταδιακής έκλουσης 30 λεπτών με ροή 0,4 mL min^{-1} ως εξής: 5% Β για 24 min, 95% Β για 4 λεπτά και επαναφορά σε 5% Β σε 2 λεπτά. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40 °C. Ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL. Η ανάλυση των δειγμάτων διεξήχθη με μέθοδο φασματομετρίας μάζας με ηλεκτροψεκασμό θετικών (ESI +) και αρνητικών (ESI-) ιόντων. Οι συνθήκες για τους δύο τρόπους ιονισμού καθορίστηκαν ως εξής: Για τον (ESI +), η θερμοκρασία στην τριχοειδή είσοδο δείγματος και η τάση μεταξύ των ηλεκτροδίων ρυθμίστηκαν στους 320 °C και 40 V, αντίστοιχα. Η ροή αερίου εκνέφωσης ρυθμίστηκε σε 40 arb και η ροή του βοηθητικού αερίου στα 8 arb. Η τάση ψεκασμού ρυθμίστηκε σε 3,6 kV και η τάση φακού του σωλήνα (tube lens) στα 120 V. Για τον (ESI-) η θερμοκρασία στην τριχοειδή είσοδο δείγματος και η τάση μεταξύ των ηλεκτροδίων ρυθμίστηκαν στους 320 °C και -20 V αντίστοιχα. Η ροή αερίου εκνέφωσης ρυθμίστηκε σε 40 arb και η ροή του βοηθητικού αερίου στα 8 arb. Η τάση ψεκασμού ρυθμίστηκε στα 2,7 kV και η τάση του φακού του σωλήνα (tube lens) στα -80 V. Μετά την ανίχνευση του ιοντικού ρεύματος εφαρμόστηκε μετασχηματισμός Fourier (FT) για τη μετατροπή του σήματος σε φάσμα m/z (FTMS). Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε για μια περιοχή μάζας 100-1000 Da. Δείγματα ελέγχου ποιότητας εγχύθηκαν καθ’ όλη τη διάρκεια της διαδικασίας προκειμένου να εξασφαλιστεί η σταθερότητα και η επαναληψιμότητα της αναλυτικής διαδικασίας.

Για την ανάλυση των αντιδράσεων που προέρχονταν από τους μικροοργανισμούς της βιβλιοθήκης TARMIC χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερηψηλής απόδοσης (UHPLC) συνδεδεμένο με φασματόμετρο υψηλής ανάλυσης HRMS/MS σε πλατφόρμα Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, Germany). Ο διαχωρισμός UHPLC πραγματοποιήθηκε από σύστημα Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific) εξοπλισμένο με δυαδική αντλία, αυτόματο δειγματολήπτη και φούρνο στήλης. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης Hypersil Gold UPLC C18 (2,1 × 150

mm, 1,9 μm). Η κινητή φάση αποτελούταν από 0,1% (ν/ν) μυρμηκικό οξύ/νερό (διαλύτης Α) και ακετονιτρίλιο (διαλύτης Β). Η σταδιακή έκλουση πραγματοποιήθηκε σε 30 λεπτά με ροή 0,22 mL min^{-1} ως εξής: 2% Β για 23 min, 95% Β για 5 λεπτά και επαναφορά σε 5% Β σε 2 λεπτά. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν και πάλι 40 °C και ο όγκος έγχυσης ήταν 3 μL. Η υψηλής ανάλυσης φασματομετρία μάζας πραγματοποιήθηκε μάζας με ηλεκτροψεκασμό θετικών (ESI +) και αρνητικών (ESI-) ιόντων. Οι συνθήκες ήταν οι εξής: η θερμοκρασία στην τριχοειδή είσοδο δείγματος ήταν 350 °C και η τάση του εκνέφωσης 50 V. Η ροή αερίου εκνέφωσης ρυθμίστηκε σε 40 arb και η ροή του βοηθητικού αερίου στα 5 arb. Η τάση ψεκασμού ρυθμίστηκε σε 2,7 kV και η τάση φακού του σωλήνα (S-lense) στα 50 V. Για τα πειράματα πλήρους σάρωσης η ανάλυση ήταν 70000. Η ικανότητα ολοκλήρωσης εξαρτώμενη από τα δεδομένα έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε ανάλυση 35000, επιτρέποντας τον κατακερματισμό MS/MS των τριών πιο έντονων ιόντων κάθε κορυφής που υπερβαίνουν το προκαθορισμένο όριο εφαρμόζοντας δυναμική εξαίρεση 10 δευτερολέπτων. Η σταδιακή κανονικοποιημένη ενέργεια σύγκρουσης ρυθμίστηκε στα 40, 60 και 100. Η απόκτηση των φασμάτων μάζας εκτελέστηκε σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιώντας τη λειτουργία του κεντροειδούς. Η απόκτηση και ανάλυση δεδομένων ολοκληρώθηκε χρησιμοποιώντας το Xcalibur 2.1. Τα δεδομένα εισήχθησαν στο λογισμικό Compound Discoverer 2.1 (Thermo Scientific) και επιλέχθηκε μία τυπική ροή εργασίας μεταβολισμού προκειμένου να ανιχνευθούν οι πιθανοί μεταβολίτες της 2,4-DCP στα εκχυλίσματα. Χρησιμοποιήθηκε η κατάλληλη διάταξη ανίχνευσης κορυφών, αποσυγκόλλησης, αποισοτοπισμού και ευθυγράμμισης.

3.6.2 Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με αναλυτή μαζών (GC-MS)

Για την ανάλυση των εκχυλισμάτων που είχαν προκύψει από τις αντιδράσεις των μικροοργανισμών με το PCB29 χρησιμοποιήθηκε η τεχνική GC-MS/MS σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας Agilent Technologies 7820A GC συνδεδεμένο με το λογισμικό ολοκλήρωσης και επεξεργασίας δεδομένων Agilent Technologies 5977B MSD (Agilent Technologies). το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του GC

ρυθμίστηκε ως εξής: 70 ºC για 0,2 min και αύξηση στους 110 ^{o}C με ρυθμό 50 ºC/min για 18 min, στους 160 ^{o}C με ρυθμό 3 ºC/min για 5 min, στους 180 ºC με ρυθμό 3 ^{o}C/min για 4 min, στους 290 ^{o}C με ρυθμό 30 ^{o}C/min για 10 min. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 64,8 min. Ο όγκος έγχυσης 1 μL σε splitless mode. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη DB-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Η πίεση ορίστηκε στα 10,42 psi με σταθερή ροή 1,1418 mL min-1, χρησιμοποιώντας ήλιο ως φέρον αέριο. Η πηγή ιόντων και η γραμμή μεταφοράς ορίστηκαν στους 280 ^{o}C.

3.7 Μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων

Η μέτρηση όλων των ενζυμικών ενεργοτήτων πραγματοποιήθηκε σε 96-well plates στο πολυφωτόμετρο SpectraMax-250 σε τελικό όγκο 250 μL με σταθερή θερμοκρασία. Καταχώρηση των μετρήσεων και υπολογισμός του ρυθμού των ενζυμικών αντιδράσεων γινόταν μέσω του λογισμικού SoftMaxPro 1.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.7.1 Διοξυγενάσες της κατεχόλης

Μια τυπική αντίδραση μέτρησης ενεργότητας περιείχε 1 mM κατεχόλη ως υπόστρωμα διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH 7. Η αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη 25 μL ενζύμου και πραγματοποιούταν στους 35 ^{o}C. Ένα Unit (U) 1,2 διοξυγενάσης της κατεχόλης (C12O) ορίζεται ως η ποσότητα ενζύμου που παράγει 1 μmol *cis,cis*-μουκονικό οξύ ανά λεπτό στις συγκεκριμένες συνθήκες. Ένα Unit 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης (C23O) ορίζεται ως η ποσότητα ενζύμου που παράγει 1 μmol 2-υδρόξυ-μουκονική ημιαλδεΰδη ανά λεπτό στις συγκεκριμένες συνθήκες. Τα προϊόντα των δύο αυτών ενζύμων ανιχνεύθηκαν στα 260 nm και 375 nm αντίστοιχα και ποσοτικοποιήθηκαν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Hupert-Kocurek et al., 2015; Lin and Milase, 2015)

3.7.2 Λακκάση

Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό υπόστρωμα ABTS (2,2′-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) το οποίο οξειδώνεται από τις λακκάσες και αποκτά πράσινο χρώμα δίνοντας μέγιστο απορρόφησης στα 420 nm. Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών pH 4,5 όγκου 200 μL προστέθηκαν 25 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραίωσης και 25 μL υδατικού διαλύματος ABTS τελικής συγκέντρωσης 20 mM. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 35 ^{o}C. Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την οξείδωση 1 μmol ABTS ανά λεπτό αντίδρασης υπό τις παραπάνω συνθήκες.

3.7.3 Πολυφαινολοξειδάση

Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η 4-χλωροκατεχόλη σε συγκέντρωση 5 mM διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M φωσφορικών pH 7. Σε 230 μL υποστρώματος προστίθενται 20 μL ένζυμο και καταγράφεται η απορρόφηση στα 440 nm για 20 min. Ενεργότητα 1 U ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που αυξάνει την απορρόφηση στα 440 nm (ΔA_{440}) κατά μία μονάδα το λεπτό.

3.8 Απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός θαλάσσιων ενζύμων

3.8.1 Επαγωγή και απομόνωση ενεργότητας 1,2-διοξυγενάσης κατεχόλης (C12O)

Η επαγωγή της ενεργότητας C12O έγινε με προσθήκη της 2,4-DCP 3 μέρες μετά τον εμβολιασμό των υγρών καλλιεργειών με τους μικροοργανισμούς με την υψηλότερη δυνατότητα απομάκρυνσης του ρύπου. Οι δειγματοληψίες έγιναν στις 15, 23, 39, 45, 63 και 69 ώρες. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν με σκοπό την απομάκρυνση στερεών που ελήφθησαν κατά την δειγματοληψία (κύτταρα, θρεπτικό). Τέλος, 0,5 mL από κάθε δείγμα οδηγήθηκε σε βρασμό για 10 min. Τα βρασμένα αυτά δείγματα χρησίμευσαν ως δείγματα ελέγχου στις αναλύσεις που ακολούθησαν. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν καθ’ όλη τη διάρκεια της

διαδικασίας σε πάγο. Ο μικροοργανισμός που εξέφραζε τη μεγαλύτερη ενεργότητα C12O καλλιεργήθηκε σε μεγαλύτερη κλίμακα για την απομόνωση του ενζύμου.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο προκαλλιέργειες των 50 mL στις οποίες έγινε εμβολιασμός από τρυβλίο με το επιλεγμένο στέλεχος. Μετά από 3 ημέρες επώασης πραγματοποιείται έκχυση των προκαλλιεργειών αυτών σε δύο κωνικές φιάλες που περιέχουν 450 mL θρεπτικού υλικού. Οι καλλιέργειες αυτές τοποθετούνται σε επωαστήρα για 3 ημέρες. Στο πέρας των τριών ημερών γίνεται προσθήκη 10 mL 2,4-DCP συγκέντρωσης 50 mM σε κάθε κωνική για επαγωγή του ενζύμου. Μετά από άλλες 3 ημέρες οι καλλιέργειες αφαιρούνται οριστικά και οδηγούνται σε διήθηση, με σκοπό τη συλλογή του εξωκυτταρικού υγρού.

Το εξωκυτταρικό στη συνέχεια συμπυκνώθηκε σε συσκευή Amicon 84000 (Millipore) χρησιμοποιώντας μεμβράνη Diaflo PM-10 (10 kDa). Το συμπύκνωμα εξισορροπήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Bis-Tris pH 6 και φορτώθηκε σε στήλη με ρητίνη Q-sepharose (2.5 x 25 cm; Amersham Biosciences AB, Sweden), η οποία είχε εξισορροπηθεί στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Η έκλουση των πρωτεϊνών έγινε με γραμμική αύξηση συγκέντρωσης NaCl από 0-1 M και με ροή 5 mL min^{-1}. Πραγματοποιούταν παράλληλα η συλλογή κλασμάτων των 10 mL στα οποία μετρούταν η περιεχόμενη πρωτεΐνη (A_{280}) και η ενεργότητα C12O. Η καθαρότητα της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).

3.8.2 Χαρακτηρισμός απομονωμένης C12O

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της απομονωμένης C12O μελετήθηκε σε εύρος θερμοκρασιών 30-60 ^{o}C στις συνθήκες αντίδρασης που περιγράφονται στην παράγραφο 3.7.1. Η θερμική σταθερότητα του ενζύμου μελετήθηκε επωάζοντας το ένζυμο σε θερμοκρασίες 40-70 ^{o}C για 0-24 h και στη συνέχεια μετρώντας την υπολειπόμενη ενεργότητα.

Η ειδίκευση στα υποστρώματα δοκιμάστηκε στην κατεχόλη, 4-χλωροκατεχόλη, 3,5-διχλωροκατεχόλη, 2,3-διυδροξυ-διφαινύλιο, 1,2,4-βενζετριόλη και στο υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Οι κινητικές σταθερές Michaelis-Menten για την οξείδωση της κατεχόλης (0-1,8 mM) και της 4-χλωροκατεχόλης (0-5 mM) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 5.

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση αλάτων NaCl και $MgCl_2$ σε συγκεντρώσεις 0-1 M στην ενεργότητα του ενζύμου.

3.8.3 Απομόνωση λακκασών

Από τα θαλάσσια στελέχη τα οποία είχαν τη δυνατότητα απομάκρυνσης του PCB29, κάποια εξέφραζαν ενεργότητα λακκάσης. Από αυτά επιλέχθηκε το στέλεχος που εξέφραζε την υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης για περαιτέρω μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επαγωγή της ενεργότητας λακκάσης ώστε να αυξηθεί το ποσό της στο εξωκυτταρικό υγρό, με σκοπό μια αποδοτικότερη μελέτη απομόνωσης.

3.8.3.1 Μελέτη επαγωγέων για την έκφραση λακκάσης

Μελετήθηκε η επίδραση ουσιών, οι οποίες βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί πως αυξάνουν την έκφραση λακκασών σε μυκητιακές καλλιέργειες. Αρχικά πραγματοποιούνται δύο προκαλλιέργειες, των 50 mL σε κάθε μια από τις οποίες γίνεται εμβολιασμός από τρυβλίο με ένα από τα μυκητιακά στελέχη. Μετά από 3 ημέρες επώασης πραγματοποιείται εμβολιασμός ποσότητας 2,5 mL (5% v/v) από τις προκαλλιέργειες σε κωνικές φιάλες που περιέχουν 50 mL θρεπτικού υλικού. Μετά από 3 ημέρες επώασης πραγματοποιείται η προσθήκη των επαγωγέων. Υπήρξαν δύο φιάλες για κάθε επαγωγέα και δύο φιάλες στις οποίες δεν είχε γίνει προσθήκη κανενός επαγωγέα (uninduced). Οι επαγωγείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 0,02 mM PCB29, 0,5 mM $CuSO_4$, 5 mM βανιλίνη και 5 mM φερουλικό οξύ.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων χαλκού (0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,5 mM) στην επαγωγή ενεργότητας λακκάσης.

3.8.3.2 Απομόνωση ενεργότητας λακκάσης

Το μελετημένο στέλεχος, ύστερα από την επιλογή των καλύτερων συνθηκών επαγωγής καλλιεργήθηκε σε 20-L αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (MBR Bioreactors, Ελβετία) με λειτουργικό όγκο 12 L. Ο αντιδραστήρας εμβολιάστηκε με 5% (w/w) προκαλλιέργεια (3 ημερών) και η επαγωγή της ενεργότητας λακκάσης έγινε με 0,5 mM $CuSO_4$. Πραγματοποιούταν αυτόματη ρύθμιση του pH (7.4) και ο αερισμός ήταν 1 vvm. Δείγματα λαμβάνονταν καθημερινά και πραγματοποιούταν μέτρηση ενεργότητας λακκάσης. Ύστερα από 3 ημέρες, το υγρό καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε (5000 x g, 15 min, 4 ^{o}C) και το υπερκείμενο πέρασε από φίλτρο 0,45 μm και στη συνέχεια συμπυκνώθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα υπερδιήθησης Pellicon® Cassette Acrylic Holder and Pump με μεμβράνη 30 kDa (Millipore, USA). Το προκύπτον συμπύκνωμα, συμπυκνώθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας συσκευή Amicon με μεμβράνη Diaflo PM-10 (10 kDa), στη συνέχεια εξισσοροπήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Piperazine-HCl pH 5,5 και φορτώθηκε σε στήλη Q-sepharose (2,5 x 25 cm). Η έκλουση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης NaCl (0-0,5 M) με ροή 4 mL min^{-1}. Κλάσματα των 6 mL συλλέγονταν και αναλύονταν για την περιεχόμενη πρωτεΐνη και την ενεργότητα λακκάσης. Οι καθαρότητα των κλασμάτων επιβεβαιώθηκε με SDS-PAGE. Δύο κλάσματα που είχαν ενεργότητα λακκάσης καθαρίστηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας στήλες DEAE-Cellulose (Piperazine-HCl pH 5.5) και and Q-sepharose (Bis-Tris pH 7), υπό τις ίδιες συνθήκες έκλουσης με την πρώτη στήλη.

3.8.4 Χαρακτηρισμός απομονωμένων λακκασών

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των ενζύμων διερευνήθηκε μετρώντας την ενεργότητά τους στο θερμοκρασιακό εύρος 30-65 °C. Για τη βέλτιστη τιμή pH

δράσης χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα: κιτρικών-φωσφορικών (pH 2-6), φωσφορικών (pH 6-7) και Tris-HCl (pH 8-9).

Για την εξέταση του εύρους των υποστρωμάτων που μπορούσαν να οξειδώσουν οι απομονωμένες λακκάσες δοκιμάστηκαν διαφορετικές φαινολικές ενώσεις οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Τα προϊόντα τους μετρήθηκαν στο μήκος κύματος που αναφέρεται και η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε με βάση τον αντίστοιχο συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας. Οι αντιδράσεις αφέθηκαν στους 35 °C για 18 h.

Πίνακας 3.1 Χημικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν ως υποστρώματα των απομονωμένων λακκασών, ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας τους (ε) για το αντίστοιχο μήκος κύματος (λmax).

Υπόστρωμα	**ε (M^{-1} cm^{-1})**	**λ_{max} (mn)**
Πυρογαλλόλη	3724	400
Γουαϊακόλη	12100	480
Κατεχόλη	928	510
2,6-Διμεθοξυφαινόλη	27500	470
L-DOPA	3700	400
Υδροκινόνη	21300	480
Καφεϊκό οξύ	14000	400
Γαλλικό οξύ	555	400

Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η δυνατότητα απομάκρυνσης του PCB29 από τις δύο απομονωμένες λακκάσες απουσία μεσολαβητή και παρουσία μεσολαβητή ABTS. Το PCB29 διαλύθηκε αρχικά σε διαλύτη DMSO και έπειτα το PCB και οι λακκάσες αραιώθηκαν με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού φωσφορικών pH=4,5 στον τελικό όγκο αντίδρασης. Ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν 500 μL. Οι αντιδράσεις στον τελικό όγκο περιείχαν 50 μL του ένζυμου, PCB συγκέντρωσης 1 μM και μεσολαβητές συγκέντρωσης 0,5 μM. Οι αντιδράσεις επωάστηκαν υπό ανάδευση 900 rpm εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στους 35 °C για 20 ώρες.

3.9 Πρωτεϊνικές αναλύσεις αλληλούχισης

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών τον απομονωμένων θαλάσσιων ενζύμων πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Proteome Factory (Γερμανία). Η ταυτοποίηση βασίζεται σε φασματομετρικές τεχνικές μάζας υψηλής ανάλυσης (nanoLC-MS/MS) σε ολιγοπεπτίδια της πρωτεΐνης που έχουν αποκτηθεί ύστερα από πέψη με την πρωτεάση θριψίνη. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης μαζών αναλύονται στη συνέχεια με το λογισμικό Mascot, το οποίο χρησιμοποιεί τις βάσεις δεδομένων NCBInr ή Swissprot ώστε να πραγματοποιήσει την ανασύσταση της αμινοξικής αλληλουχίας της άγνωστης πρωτεΐνης. Για να είναι επιτυχής η ανάλυση θα πρέπει μία αλληλουχία των βάσεων δεδομένων να είναι πολύ όμοια (ή ίδια) με την πρωτεΐνης-στόχου.

3.10 Βιοχημικές μελέτες της πολυφαινολοξειδάσης (PPO) του *T. thermophila*

3.10.1 Κλωνοποίηση γονιδίου και μετασχηματισμός κυττάρων *Pichia pastoris*

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την υποθετική πρωτεΐνη *Tt*PPO (protein Id: 60685; chromosome_6:1676944-1678961, χωρίς το φυσικό πεπτίδιο-σήμα) ενισχύθηκε από το γενωμικό DNA του *T. thermophila* με PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 60685-F/60685-R (Πίνακας 3.2), οι οποίοι σχεδιάστηκαν με βάση τη διαθέσιμη αλληλουχία και οι οποίοι περιελάμβαναν τις περιοριστικές περιοχές των ενδονουκλεασών *Eco*RI και *Xba*I στα αντίστοιχα 5'-άκρα. Η ενίσχυση του DNA πραγματοποιήθηκε από την KOD Hot Start πολυμεράση για 35 κύκλους αποδιάταξης (94 ^{o}C για 15 s), υβριδισμού εκκινητών (61 ^{o}C για 30 s) και επιμήκυνσης (68 ^{o}C για 100 s). Από τους κύκλους αυτούς προηγήθηκε ένα βήμα αρχικής αποδιάταξης στους 95 ^{o}C για 2 min και μετά τους κύκλους ακολούθησε ένα βήμα επιμήκυνσης για 2 min στους 68 ^{o}C. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR™-Blunt σύμφωνα με το Zero Blunt® PCR Cloning Kit και προσδιορίστηκε η αλληλουχία του. Η απομάκρυνση του ενός ιντρονίου

που περιέχεται στο γονίδιο πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της PCR με επικαλυπτόμενη επιμήκυνση (overlap extension-PCR). Ο ανασυνδυασμένος φορέας pCR™-Blunt/*Tt60685* χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για την ενίσχυση των 2 εξωνίων του γονιδίου με τη χρήση πολυμεράσης KOD Hot Start. Οι αντιδράσεις PCR είχαν ως εξής: για το πρώτο εξώνιο (εκκινητές 60685-F/60685e-R) 94 °C για 2 min, ακολουθούμενοι από 35 κύκλους 94 °C για 15 s, 61 °C για 30 s και 68 °C for 30 s, με τελική επιμήκυνση στους 68 °C για 2 min, ενώ για το δεύτερο εξώνιο (εκκινητές 60685e-F/60685-R) 94 °C για 2 min, ακολουθούμενοι από 35 κύκλους 94 °C για 15 s, 61 °C για 30 s και 68 °C for 70 s, με τελική επιμήκυνση στους 68 °C για 2 min. Στη συνέχεια τα δύο τμήματα ενώθηκαν με μία PCR χρησιμοποιώντας τους εξωτερικούς εκκινητές (60685-F/60685-R), χρησιμοποιώντας τις συνθήκες της αρχικής αντίδρασης με τη διαφορά ότι το στάδιο της επιμήκυνσης διήρκησε 80 s αντί για 100 s. Το τελικό προϊόν κλωνοποιήθηκε στον φορέα pCR™-Blunt και αλληλουχήθηκε.

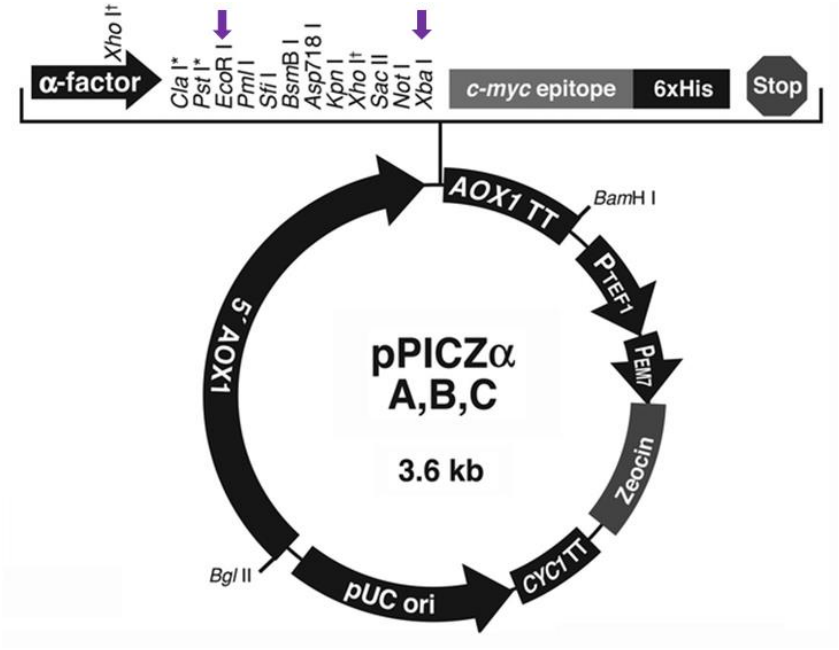
Πίνακας 3.2 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γονιδίου της *Tt*PPO, για την απομάκρυνση του ιντρονίου, καθώς και για τις μεταλλάξεις σημείου.

Εκκινητής	**Νουκλεοτιδική αλληλουχία (5'→3')**	**Μήκος (nt)**
60685-F	GCGAATTCCGCTGTTCTTCCGATGCGCC[1]	28
60685-R	GCTCTAGATAAAAGTAGCACAGCTCGCC[1]	28
60685e-F	CGGGTCTCTGTCCAAGGATG	20
60685e-R	CTTGGACAGAGACCCGTATTCGCGGCGAAAGATGAGC	37
G292N-F	GAGATCGGCCCCCACAACGGCATCCACTACAC	32
G292N-R	GTGTAGTGGATGCCGTTGTGGGGGCCGATCTC	32
L306A-F	CGGGCGGCGACGCATTCACCTCCCCCGG	28
L306A-R	CCGGGGGAGGTGAATGCGTCGCCGCCCG	28
Y296V-F	CGGCATCCACGTAACCATCGGCGGCGACCC	30
Y296V-R	GGGTCGCCGCCGATGGTTACGTGGATGCCG	30

[1]Οι περιοχές περιορισμού για το ζεύγος αυτό ήταν: *Eco*RI: GAATTC και *Xba*I: TCTAGA.

Το γονίδιο *Tt60685* αποκόπηκε από τον πλασμιδιακό φορέα ύστερα από πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Eco*RI και *Xba*I, καθαρίστηκε και

κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pPICZαA ύστερα από τον α-παράγοντα έκκρισης (α-factor) και πριν από τον επίτοπο *c-myc* και το πεπτίδιο των 6 Ιστιδινών (His-tag) (Εικόνα 3.1). Η επιτυχία της κλωνοποίησης επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση του πλασμιδίου pPICZαA/*Tt60685* το οποίο ενισχύθηκε σε κύτταρα *E. coli* TOP10F' με αντίσταση σε 25 μg Zeocin™ mL^{-1}. Το σωστά ανασυνδυασμένο πλασμίδιο γραμμικοποιήθηκε με το περιοριστικό ένζυμο *Pme*I και χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματίσει κύτταρα Pichia pastoris X-33, με ηλεκτροδιάτριση, σύμφωνα με το πρωτόκολλο EasySelect™ *Pichia* Expression kit.



Εικόνα 3.1 Πλασμιδιακός φορέας ετερόλογης έκφρασης pPIZαA για το σύστημα της *P. pastoris* στον οποίο διακρίνεται το σημείο στο οποίο κλωνοποιήθηκε το γονίδιο *Tt60685*. Με μωβ βέλη επισημαίνονται τα σημεία που κόβουν τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν (*Eco*RI και *Xba*I).

3.10.2 Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένης *Tt*PPO

Τριάντα δύο μετασχηματισμένες αποικίες που μεγάλωσαν σε τρυβλία με υπόστρωμα YPDS (Yeast, Peptone, Dextrose, Sorbitol) και 100 μg Zeocin™ mL^{-1} ανακαλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με μέσο μεθανόλης (1.34 % w/v βάση αζώτου ζύμης, 4 $\times 10^{-5}$ % w/v βιοτίνη and 0.5 % v/v μεθανόλη) τα οποία επωάστηκαν

στους 30 ^{o}C για 3 ημέρες. Στη συνέχεια, 3 mL από διάλυμα 10 mM 4-χλωροκατεχόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM φωσφορικό νάτριο pH 7 αποχύθηκαν απαλά και ομοιόμορφα στο τρυβλίο το οποίο επωάστηκε στους 60 ^{o}C για 15-30 min. Τα οξειδωμένα (σκούρο καφέ) προϊόντα που εμφανίστηκαν πάνω και γύρω από τις αποικίες ήταν ενδεικτικά της ποσότητας του εκφραζόμενου ανασυνδυασμένου ενζύμου. Με βάση το σχηματισμό του χρώματος, επιλέχθηκαν εφτά αποικίες με περαιτέρω μελέτη έκφρασης σε υγρές καλλιέργειες. Δείγματα από το εξωκυτταρικό σε καλλιέργειες με μεθανόλη ως επαγωγέα, χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση ενεργότητας πολυφαινολοξειδάσης. Ο κλώνος με τη μεγαλύτερη ενεργότητα χρησιμοποιήθηκε για τις υπόλοιπες μελέτες.

Η επίδραση της προσθήκης $CuSO_4$ (0-100 μM) στην ενεργότητα που εκφράζεται μελετήθηκε επίσης, καθώς η PPO περιέχει χαλκό στο ενεργό της κέντρο. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας επαγωγής (23 ή 30 ^{o}C).

Η ανασυνδυασμένη *Tt*PPO απομονώθηκε από καλλιέργειες 2 L ύστερα από 4 ημέρες επαγωγή στους 23 ^{o}C και 200 rpm. Ύστερα από συμπύκνωση του, το εξωκυτταρικό υγρό περάστηκε από στήλη ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου για την απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σύμφωνα με καθιερωμένη μέθοδο (Topakas et al., 2012). Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της καθαρότητας την απομονωμένης πρωτεΐνης και την εύρεση του μοριακού της βάρους. Για τη διερεύνηση πιθανής N-γλυκοζυλίωσης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση με την ενδογλυκοζιδάση Endo H (NEB, USA) υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Ζυμογράφημα πάνω στη γέλη του SDS-PAGE πραγματοποιήθηκε για μη αποδιατεταγμένα ένζυμα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η γέλη ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό 2 φορές και βυθίστηκε σε διάλυμα in 2.5 mM 4-χλωροκατεχόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM sodium phosphate pH 7. Το τζελ επωάστηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σκούρες καφέ ζώνες εμφανιστούν.

3.10.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός ανασυνδυασμένης *Tt*PPO

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης μελετήθηκε στις προαναφερόμενες συνθήκες αντίδρασης στο εύρος 30-70 ^{o}C, ενώ η θερμοσταθερότητα βρέθηκε επωάζοντας το ένζυμο σε θερμοκρασίες 40-70 ^{o}C για 0.5-24 h. Το βέλτιστο pH προσδιορίστηκε στο εύρος 3-9 για τα εξής ρυθμιστικά διαλύματα: κιτρικών-φωσφορικών (pH 3-6), φωσφορικών (pH 6-8) και Tris-HCl (pH 8-9).

Το εύρος των υποστρωμάτων που μπορεί να οξειδώσει η *Tt*PPO μελετήθηκε σε αντιδράσεις με 2 mM υπόστρωμα σε 0.1 M sodium phosphate pH 7 για 20 h στους 35 ^{o}C. Το UV/Vis φάσμα κάθε αντίδρασης καταγράφηκε και συγκρίθηκε με την αντίδραση ελέγχου (χωρίς ένζυμο). Η ενεργότητα για κάθε υπόστρωμα υπολογίστηκε ως το ΔΑ στο μήκος κύματος όπου τα προϊόντα παρουσίαζαν μέγιστο (λ_{max}). Για τα περισσότερα προϊόντα το λmax ήταν 400 nm εκτός από τα παρακάτω: 4-χλωροκατεχόλη και κατεχίνη 440 nm, ρεζορκινόλη 450 nm, συριγκόλη 470 nm, L-DOPA 475 nm, επικατεχίνη/υδροκινόνη/3,5-διχλωροκατεχόλη 480 nm, φαινόλη 530 nm. Τα υποστρώματα στα οποία το ένζυμο είχε υψηλή ενεργότητα μελετήθηκαν περαιτέρω για τον προσδιορισμό της ειδικής ενεργότητας του ενζύμου καθώς και για την εύρεση των κινητικών σταθερών. Για κάθε υπόστρωμα 1 U ορίστηκε ως 1 $\Delta A_{\lambda max}$ min^{-1}.

Οι κινητικές μελέτες με το απομονωμένο ένζυμο πραγματοποιήθηκαν για τα εξής υποστρώματα: 4-χλωροκατεχόλη (0-5 mM), κατεχόλη (0-60 mM), κατεχίνη (0-10 mM), L-DOPA (0-7 mM mM), βανιλλίνη (0-5 mM), γουαιακόλη (0-15 mM) και υδροκινόνη (0-70 mM). Οι κινητικές σταθερές προσδιορίστηκαν μέσω του λογισμικού GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA).

Η συγκέντρωση της καθαρής πρωτεΐνης προσδιορίστηκε μέσω του A_{280} (Stoscheck, 1990) χρησιμοποιώντας για συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας 75540 M^{-1} cm^{-1}, ο οποίος υπολογίστηκε από το πρόγραμμα ProtParam της ExPASy (Gasteiger et al., 2005).

3.10.4 Σημειακές μεταλλάξεις της *Tt*PPO

Τα τροποποιημένα ένζυμα κατασκευάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pPICZαA/*Tt60685* ως πρότυπο και τα ζεύγη εκκινητών του Πίνακα 3.2. Η σωστή αλληλουχία των μεταλλαγμένων πλασμιδίων επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση και τα γραμμικοποιημένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό κυττάρων *P. pastoris* όπως αναφέρεται παραπάνω.

3.10.5 Μετασχηματισμός χλωροφαινολών

Η φαινόλη, οι μονο- και δι-χλωροφαινόλες χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα της *Tt*PPO και των τροποποιημένων ενζύμων σε τελική συγκέντρωση 5 mM. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε Eppendorf Thermomixer® Comfort στους 30 ^{o}C/900 rpm για 16 h. Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση σε κάθε αντίδραση και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη αντίδραση ελέγχου.

Για κάθε υπόστρωμα, το πιο ικανό τροποποιημένο ένζυμο συγκρίθηκε με το φυσικό ένζυμο *Tt*PPO για τη δυνατότητα απομάκρυνσής του. Αντιδράσεις (1 mL) με 2 και 5 mM υπόστρωμα αναλύθηκαν μετά από 20 h αντίδραση ύστερα από την προσθήκη 0.09 mg από το αντίστοιχο ένζυμο. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη 0,1 mL 1 N HCl για τον τερματισμό της αντίδρασης και τα δείγματα αναλύθηκαν ύστερα από απομάκρυνση των στερεών. Η ποσοτικοποίηση της εναπομείνασας χλωροφαινόλης πραγματοποιήθηκε με ανάλυση HPLC σύμφωνα με καθιερωμένη μέθοδο (Davis et al., 2018). Περιληπτικά χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης C-18 και η έκλουση πραγματοποιήθηκε με 50% (v/v) διάλυμα μεθανόλης σε 0,1% (v/v) φωσφορικό οξύ.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4 Μελέτη του δυναμικού αποτοξικοποίησης της 2,4-DCP από θαλάσσιους μύκητες

Το θαλάσσιο περιβάλλον αποτελεί αναξιοποίητη πηγή μικροβιακής ποικιλότητας, παρουσιάζοντας διάφορα χαρακτηριστικά που είναι πολύτιμα για τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της βιοαποικοδόμησης, λαμβάνοντας ιδιαίτερα υπόψη ότι ένα μεγάλο μέρος της ρύπανσης της Γης εμφανίζεται στους ωκεανούς. Μια εξαιρετικά ενδιαφέρουσα πηγή θαλάσσιας βιοποικιλότητας η οποία έχει μελετηθεί ελάχιστα είναι οι συμβιωτικοί μύκητες των ασπόνδυλων (π.χ. ασκίδες και σφουγγάρια) (Nikolaivits et al., 2017).

Οι μικροοργανισμοί που προέρχονται από παρθένα περιβάλλοντα δεν έχουν απαραιτήτως την ικανότητα να αποτοξικοποιούν αλογονωμένους οργανικούς ρύπους, καθώς είναι πιθανό να μην έχουν συναντήσει ποτέ τέτοια μόρια ώστε να αναπτύξουν ειδικούς μηχανισμούς άμυνας. Ωστόσο, υπάρχουν φυσικές αλογονωμένες ενώσεις που εμφανίζονται στη θάλασσα (Gribble, 2015), μερικές από τις οποίες είναι παρόμοιες με ανθρωπογενείς ρύπους, όπως οι βρωμιωμένοι διφαινυλαιθέρες. Πολλοί οργανισμοί, όπως τα σφουγγάρια και τα κοράλλια ή οι συμβιώτες τους, πιστεύεται ότι παράγουν αλογονωμένες οργανικές ενώσεις ως άμυνα εναντίον αρπακτικών οργανισμών (Atashgahi et al., 2018). Επομένως, οι συμβιώτες αυτών των θαλάσσιων ασπόνδυλων μπορεί να έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις.

Οι μύκητες που προέρχονται από θαλάσσια οικοσυστήματα είναι πολλά υποσχόμενοι μικροοργανισμοί που δύναται να χρησιμοποιηθούν σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, χάρη στις μοναδικές ιδιότητες που απέκτησαν μέσω της προσαρμογής τους σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως υψηλή αλατότητα, χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, υψηλή πίεση, ακραία θερμοκρασία και χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών (Nicoletti and Andolfi, 2018; Nikolaivits et al., 2017). Μέχρι στιγμής, οι μύκητες που προέρχονται από τη θάλασσα έχουν χρησιμοποιηθεί για την βιοεξυγίανση συστατικών του αργού πετρελαίου, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs - φαινανθρένιο, πυρένιο, βενζο[α]πυρένιο) και αλειφατικά αλκένια, αλλά και 1,4,6-

τρινιτροτολουόλιο και εξαϋδρο-1,3,5-τρινιτρο-1,3,5-τριαζίνη, που προέρχεται από μη εκραγέντα όπλα (Birolli et al., 2018; Bovio et al., 2017; Nicoletti and Andolfi, 2018). Υπάρχουν επίσης μερικές αναφορές σχετικά με την αποικοδόμηση των φυτοφαρμάκων - τα περισσότερα από τα οποία είναι χλωριωμένες ενώσεις - όπως 1,1-διχλωρο-2,2-δις-(4-χλωροφαινυλ)αιθάνιο (DDD), esfenvalerate, dieldrin και μέθυλ παραθίο (Nicoletti and Andolfi, 2018).

Στην παρούσα ενότητα διερευνήθηκε η δυνατότητα θαλάσσιων μυκήτων για την απομάκρυνση της 2,4-DCP. Οι μικροοργανισμοί με υψηλή δυνατότητα μελετήθηκαν περαιτέρω για τη διαλεύκανση των μηχανισμών με τους οποίους μπορούν να αποτοξικοποιήσουν τον χλωριωμένο αυτό αρωματικό ρύπο.

4.1 Μελέτη του μηχανισμού αποικοδόμησης της 2,4-DCP από τη μικροβιακή βιβλιοθήκη TARMIC

Η βιβλιοθήκη TARMIC αποτελείται από 60 μυκητιακά στελέχη απομονωμένα από θαλάσσια ασπόνδυλα, τα οποία είχαν συλλεχθεί από μεσόφωτα κοραλλιογενή οικοσυστήματα (Mesophotic Coral Ecosystems – MCEs). Τα MCEs είναι τροπικά ή υπο-τροπικά οικοσυστήματα εξαρτώμενα από το φως, σε βάθος περίπου 4-50 m κάτω από την επιφάνεια του νερού έως και 150 m. Παρόλο που είναι γνωστό πως έχουν πλούσια βιοποικιλότητα, παραμένουν σχετικά υπομελετημένα, λόγω των περιορισμών που επιβάλλονται από την τοποθεσία τους. Μόνο πρόσφατα, έχουν αποκτήσει μεγαλύτερη προσοχή ως αποτέλεσμα των τεχνολογικών εξελίξεων, όπως τα οχήματα με τηλεχειρισμό (remotely operated vehicles – ROV) και τα αυτόνομα υποβρύχια οχήματα (autonomous underwater vehicles – AUVs) (Turner et al., 2017).

Τα στοιχεία που έχουμε συγκεντρώσει σχετικά με τη βιοποικιλότητα αυτών των οικοσυστημάτων είναι μάλλον προκατειλημμένα λόγω των περιορισμένων γεωγραφικών περιοχών που έχουν διερευνηθεί μέχρι σήμερα, δηλαδή του Δυτικού Ατλαντικού Ωκεανού, του Αρχιπελάγους της Χαβάης, του Μεγάλου Κοραλλιογενή Ύφαλου στην Αυστραλία και της Ερυθράς Θάλασσας (Sinniger et al., 2016). Γι αυτό το λόγο, προσπαθήσαμε να αποκτήσουμε πρόσβαση στη

βιοποικιλότητα των συμβιωτικών μυκητιακών στελεχών που απομονώθηκαν από μεσόφωτα ασπόνδυλα άλλων περιοχών και να μελετήσουμε το δυναμικό τους στην βιοαποικοδόμηση του 2,4-DCP. Οι μύκητες απομονώθηκαν από ασπόνδυλα που συλλέχθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές τοποθεσίες, δηλαδή τη θάλασσα Ανταμάν, την Ερυθρά Θάλασσα (περιοχή Eilat), τη Δυτική και την Ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα. Τα ασπόνδυλα ήταν κοράλλια και σφουγγάρια (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1 Ποσοστό απομάκρυνσης της 2,4-DCP από resting-cell αντιδράσεις τη 10η μέρα. Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με βάση την ITS αλληλουχία τους. Πληροφορίες σχετικές με το ασπόνδυλο και την τοποθεσία από την οποία απομονώθηκαν: Ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα (Med E), Δυτική Μεσόγειο Θάλασσα (Med W), βόρεια Ερυθρά Θάλασσα (Eilat) και θάλασσα Ανταμάν (Andaman).

Κωδικός στελέχους	**Ασπόνδυλο προέλευσης**	**Τοποθεσία**	**Βάθος (m)**	**Ταυτοποίηση στελέχους**	**% απομάκρυνση DCP**
TM2-S5	Σπόγγος πάνω σε *Spondylus*	Med E	38	*Penicillium steckii*	58,5
TM6-S1	*Dendronephthya* sp.	Eilat	120	*Aspergillus tubingensis*	23,2
TM6-S2	*Dendronephthya* sp.	Eilat	120	*Penicillium kewense*	9,3
TM37-S2	*Spondylus* sp.	Eilat	49	*Penicillium chrysogenum*	49,2
TM38-S1	*Polycarpa* sp.	Eilat	49	*Penicillium* sp.	56,2
TM9-S2	*Theonella* sp.	Eilat	65	*Chrysosporium* sp.	74,0
TM43-S1	*Xestospongia* sp.	Andaman	30-40	*Penicillium* sp.	17,5
TM43-S3	*Xestospongia* sp.	Andaman	30-40	*Cladosporium halotolerans*	4,5
TM46-S1	*Thrinacophora* sp.	Andaman	30-40	*Cladosporium* sp.	30,4
TM47-S1	*Chondrilla* sp.	Andaman	30-40	*Cladosporium halotolerans*	46,9
TM116-S2	*Xestospongia* sp.	Andaman	30-40	*Aspergillus* sp.	28,4
TM116-S3	*Xestospongia* sp.	Andaman	30-40	*Hortaea* sp.	9,5

				(yeast)	
TM122-S1	*Iotrochota* sp.	Andaman	30-40	*Aspergillus* sp.	21,7
TM122-S2	*Iotrochota* sp.	Andaman	30-40	*Aspergillus fumigatus*	29,5
TM124-S1	*Echinaster sepositus*	Med W	30-40	*Aspergillus* sp.	69,0
TM125-S2	*Clavelina dellavallei*	Med W	30-40	*Penicillium* sp.	51,6
TM125-S3	*Clavelina dellavallei*	Med W	30-40	*Penicillium* sp.	50,2
TM126-S1	*Clayx nicaensis*	Med W	30-40	*Aspergillus* sp.	47,0
TM133-S2	*Cerianthus membranaceus*	Med W	30-40	*Penicillium crustosum*	10,6
TM138-S1	*Didemnum maculosum*	Med W	30-40	*Purpureocillium lilacinum*	26,2
TM138-S3	*Didemnum maculosum*	Med W	30-40	*Cladosporium* sp.	16,8
TM138-S4	*Didemnum maculosum*	Med W	30-40	*Purpureocillium lilacinum*	24,6
TM2-S6	Σπόγγος πάνω σε *Spondylus*	Med E	38	*Aspergillus* sp.	55,6
TM7-S1	*Siphonogorgia* sp.	Eilat	120	*Penicillium* sp.	29,3
TM30-S1	*Diacarnus erythraenus*	Eilat	49	*Penicillium fellutanum*	37,1
TM220-S1	Gorgonian κατάφυτη από *Antipathozoanthus* sp.	Eilat	75	*Cladosporium sphaerospermum*	40,9
TM220-S4	Gorgonian κατάφυτη από *Antipathozoanthus* sp.	Eilat	75	*Penicillium* sp.	47,1
TM225-S2	*Villogorgia nozzolea*	Eilat	68	*Penicillium chrysogenum*	9,0
TM226-S1	*Callyspongia* sp.	Eilat	86	*Cladosporium halotolerans*	36,2
TM226-S2	*Callyspongia* sp.	Eilat	86	*Penicillium chrysogenum*	9,7
TM230-S1	*Siphonogorgia* sp.	Eilat	115	*Penicillium* sp.	55,0

TM230-S6	*Siphonogorgia* sp.	Eilat	115	*Penicillium* sp.	32,5
TM242-S1	Πορτοκαλί/μπεζ gorgonian	Eilat	152	*Penicillium chrysogenum*	44,0
TM53-S1	*Plakina* sp.	Andaman	30-40	*Cladosporium* sp.	16,3
TM54-S1	*Terpios* sp.	Andaman	30-40	*Aspergillus* sp.	40,0
TM58-S1	*Biemna* sp.	Andaman	30-40	*Penicillium* sp.	30,0
TM58-S2	*Biemna* sp.	Andaman	30-40	*Aspergillus niger*	46,0
TM65-S2	*Padina* sp	Andaman	30-40	*Pseudocercospore lla* sp.	46,4
TM65-S4	*Padina* sp	Andaman	30-40	*Acremonium* sp.	28,3
TM75-S1	*Ulva* sp.	Andaman	30-40	*Aspergillus* sp.	21,6
TM83-S1	Bryozoan	Andaman	30-40	*Cladosporium halotolerans*	15,6
TM83-S2	Bryozoan	Andaman	30-40	*Cladosporium halotolerans*	33,7
TM116-S1	*Xestospongia* sp.	Andaman	30-40	*Aspergillus aculeolatus*	24,6
TM122-S3	*Iotrochota* sp.	Andaman	30-40	*Aspergillus creber*	62,0
TM122-S4	*Iotrochota* sp.	Andaman	30-40	*Obolarina* sp.	40,1
TM124-S4	*Echinaster sepositus*	Med W	30-40	*Aspergillus* sp.	36,0
TM124-S7	*Echinaster sepositus*	Med W	30-40	*Aspergillus* sp.	46,4
TM132-S1	*Haliclona mediterranea*	Med W	30-40	*Aspergillus* sp.	24,9
TM139-S3	*Balanophyllia regia*	Med W	30-40	*Penicillium polonicum*	8,3
TM141-S1	*Cliona celata*	Med W	30-40	*Alternaria* sp.	22,3
TM141-S2	*Cliona celata*	Med W	30-40	*Alternaria* sp.	16,3
TM141-S3	*Cliona celata*	Med W	30-40	*Alternaria* sp.	39,8
TM148-S1	*Astropecten bispinosus*	Med W	30-40	*Aspergillus* sp.	24,9

Από τα 60 στελέχη, τα 52 είχαν τη δυνατότητα να μετατρέπουν σημαντικά τη 2,4-DCP. Το 81% από αυτά ανήκαν σε 3 γένη: *Aspergillus* (31%), *Penicillium* (33%) και *Cladosporium* (17%). Είκοσι στελέχη είχαν τη δυνατότητα μετατροπής πάνω από 40% της αρχικής 2,4-DCP συμπεριλαμβανομένων 7 *Aspergillus*, 8

Penicillium, 2 *Cladosporium,* 1 *Obolarina,* 1 *Pseudocercosporella* και 1 *Chrysosporium*. Από αυτά επιλέχθηκαν τελικά όσα είχαν δυνατότητα απομάκρυνσης του ρύπου πάνω από 55%, δηλαδή τα *Penicillium steckii* TM2-S5 (58,5%), *Chrysosporium* sp.TM9-S2 (74,0%), *Penicillium* sp. TM38-S1 (56,2%), *Aspergillus creber* TM122-S3 (62,0%) και *Aspergillus* sp. TM124-S1 (69,0%). Ωστόσο, η ικανότητα μετατροπής δεν ήταν δυνατό να συνδεθεί με την περιοχή συλλογής, το βάθος ή τη φύση του ασπόνδυλου ξενιστή, υποδεικνύοντας ότι μόνο το γενετικό υπόβαθρο και οι μεταβολικές ικανότητες συγκεκριμένων γενών απαιτούνται και επηρεάζονται ελαφρώς από συνθήκες των εκάστοτε οικολογικών ενδιαιτημάτων.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αρχική συγκέντρωση της 2,4-DCP που χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία διαλογής ήταν υψηλή (1 mM ή 163 mg L^{-1}) σε σύγκριση με την υπόλοιπη βιβλιογραφία, επομένως μόνο τα στελέχη με αυξημένη ανοχή σε αυτόν τον ρύπο και το υψηλό δυναμικό βιομετατροπής θα μπορούσαν να επιτύχουν αυξημένες αποδόσεις.

Σε μία παλιότερη εργασία το 2005 πραγματοποιήθηκε διαλογή σε 90 μυκητιακά στελέχη, που ήταν γνωστό ότι είχαν τη δυνατότητα να αποτοξικοποιούν ξενοβιοτικά (ζιζανιοκτόνα φαινυλουρίας, πενταχλωρονιτροβενζόλιο και πενταχλωροφαινόλη), για τη δυνατότητά τους να βιομετατρέπουν τη 2,4-DCP σε αρχική συγκέντρωση 100 mg L^{-1} (Vroumsia et al., 2005). Από αυτά, μόνο τρία ήταν σε θέση να φθάσουν σε αποδόσεις άνω του 50%, μετά από 5 ημέρες.

Επιπλέον, ένα στέλεχος *Bacillus* το οποίο απομονώθηκε από καλλιέργειες εμπλουτισμού με χλωροφαινόλη μιας δεξαμενής αερισμού βιομηχανίας χαρτοπολτού μπορούσε να απομακρύνει ~25% 2,4-DCP συγκέντρωσης 0,56 mM μετά από 9 ημέρες (Matafonova et al., 2006). Επίσης ένα στέλεχος *Pseudomonas putida* ήταν ικανό να αφαιρέσει 35% από 51 mg L^{-1} 2,4-DCP (Kargi and Eker, 2005). Με τον ίδιο τρόπο, ο Βασιδιομύκητας *Phanerochaete chrysosporium* μπορούσε να βιομετατρέψει ~20% από 100 mg L^{-1} 2,4-DCP παρουσία 2 mg L^{-1} καδμίου. Για αρχικές συγκεντρώσεις υψηλότερες από 40 mg L^{-1} 2,4-DCP, η

συνολική απομάκρυνση ήταν μικρότερη από 40% μετά από 4,5 ημέρες (A. Chen et al., 2011).

4.1.1 Ταυτοποίηση μεταβολιτών της 2,4-DCP από TARMIC στελέχη

Όσον αφορά τη βιομετατροπή των CPs, η πλειοψηφία των μελετών χρησιμοποιεί βακτήρια, ενώ οι έρευνες με μύκητες, πόσο μάλλον προερχόμενους από τη θάλασσα, είναι πολύ λίγες. Τα βακτήρια διαφόρων γενών έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν όλα τα είδη των CPs αερόβια. Ειδικότερα, εκπρόσωποι των γενών *Pseudomonas, Rhodococcus, Bacillus* και *Cupriavidus* έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν τις διχλωροφαινόλες (Arora and Bae, 2014). Ο γενικός μηχανισμός για την βακτηριακή αερόβια αποικοδόμηση περιλαμβάνει την αρχική *ορθο*-υδροξυλίωση του DCP, ακολουθούμενη από την *ορθο*-διάσπαση της κατεχολικής δομής και την ταυτόχρονη απελευθέρωση του *παρα*-χλωρίου που οδηγεί στο σχηματισμό 2-χλωρομηλεϊνικού οξέος (chloromaleylacetic acid), το οποίο μπορεί να αφαλογονωθεί περαιτέρω (El-Naas et al., 2017). Το στέλεχος *Cupriavidus necator* JMP222 αναφέρεται ότι αποικοδομεί τη 2,4-DCP διαμέσου μιας οδού *μετα*-διάσπασης, παράγοντας έτσι 2-υδροξυ-3,5-διχλωρο-6-οξο-εξα-2,4-διενοϊκό οξύ (Arora and Bae, 2014).

Η αποτοξικοποίηση ξενοβιοτικών από ανώτερους οργανισμούς και μύκητες λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια γνωστά ως φάση I και φάση II. Η φάση I περιλαμβάνει την τροποποίηση της ένωσης με την προσθήκη μιας λειτουργικής ομάδας, που συνήθως εκτελείται από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Τα προϊόντα της φάσης I μπορούν στη συνέχεια να υποστούν αντιδράσεις συζεύξεως για να σχηματίσουν συζεύξεις θειωδών, γλυκουρονιδών, γλυκοζιτών ή γλουταθειόνης. Τα ένζυμα συζεύξεως φάσης II, όπως σουλφοτρανσφεράσες, γλυκοσυλοτρανσφεράσες, S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης, είναι μη-ειδικά, δημιουργώντας λιγότερο τοξικούς μεταβολίτες οι οποίοι μπορούν εύκολα να αποβληθούν από το κύτταρο και συνήθως δεν υποβάλλονται σε περαιτέρω τροποποιήσεις (Aranda, 2016; Marco-Urrea and Reddy, 2012).

Η αυξημένη αναλυτική δύναμη των μετρήσεων MS/MS σε συνάρτηση με τις ακριβείς μετρήσεις μάζας (Δm<5 ppm) του αναλυτή Orbitrap επέτρεψε τον ασφαλή χαρακτηρισμό αρκετών ενώσεων στα μείγματα των αντιδράσεων. Από τις χαρακτηρισμένες ενώσεις, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση σε αυτές που υποδεικνύονται από τη μελέτη μεταβολισμού της 2,4-DCP, ως πιθανοί μεταβολίτες και προϊόντα αποικοδόμησης. Η εκτεταμένη ταυτοποίηση των ξενοβιοτικών μεταβολιτών εκτελέστηκε με το λογισμικό Compound Discoverer 2.1 (Thermo Fisher Scientific™ - San Jose, CA, USA) σε σύγκριση με τις εσωτερικές βιβλιοθήκες φασμάτων. Αυτές οι υποδεικνυόμενες ενώσεις αξιολογήθηκαν περαιτέρω σε σύγκριση με δεδομένα από τη βιβλιογραφία και τελικά αναδείχθηκαν ως ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα του μεταβολισμού της 2,4-DCP παρουσία συγκεκριμένου μικροβιακού στελέχους. Οι επισημανθείσες ενώσεις, που περιγράφονται παρακάτω, δεν υπήρχαν στα δείγματα ελέγχου. Η προτεινόμενη στοιχειακή σύνθεση (EC), τα υποδεικνυόμενα ισοδύναμα διπλού δεσμού δακτυλίου (RDBeq) και τα ειδικά ισοτοπικά πρότυπα για τα χλωριωμένα και τα θειωμένα μόρια όχι μόνο για το μοριακό ιόν, αλλά και για το θραύσμα HRMS/MS βοήθησαν σημαντικά στη δομική ταυτοποίηση.

Οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν υποδεικνύονται ως μεταβολίτες της 2,4-DCP με βάση την προαναφερθείσα διαδικασία ταυτοποίησης και παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2 Μεταβολίτες της 2,4-DCP που εντοπίστηκαν στις resting-cell αντιδράσεις. Rt: χρόνος έκλουσης, $[M - H]^-$: m/z του ψευδομοριακού ιόντος, EC: στοιχειακή σύνθεση, MS^2: τα κύρια MS/MS θραύσματα για κάθε ψευδομοριακό ιόν μαζί με τα αντίστοιχα EC.

A/A	**Rt (min)**	**$[M - H]^-$**	**EC**	**MS^2**	**Μικροοργανισμός**
(1)	4.90	271.0480	$C_{11}H_{13}ClN_2O_4$	114.9515 (C_4O_2Cl), 191.0924 ($C_{11}H_{13}O_2N$)	*Penicillium steckii* TM2-S5, *Chrysosporium* sp. TM9-S2, *Aspergillus creber* TM122-S3, *Aspergillus* sp. TM124-S1
(2)	6.98	287.0429	$C_{11}H_{13}O_5N_2Cl$	-	*Chrysosporium* sp. TM9-S2, *Aspergillus* sp. TM124-S1,

					Penicilluim sp. TM38-S1
(3)	7.01	125.0233	$C_6H_6O_3$	-	*Penicillium steckii* TM2-S5, *Penicilluim* sp.TM38-S1, *Aspergillus creber* TM122-S3, *Aspergillus* sp. TM124-S1
(4)	8.87	415.1801	$C_{22}H_{34}Cl_2O_3$	-	All
(4)	9.06	415.1801	$C_{22}H_{34}Cl_2O_3$	-	All
(5)	9.42	245.9986	$C_9H_{10}NClO3S$	158.9675 (C_6H_4OClS)	*Chrysosporium* sp. TM9-S2
(5)	9.63	245.9986	$C_9H_{10}NClO3S$	158.9675 (C_6H_4OClS)	*Chrysosporium* sp. TM9-S2
(6)	10.24	279.9596	$C_9H_9O_3NSCl_2$	-	*Chrysosporium* sp. TM9-S2
(6)	10.42	279.9596	$C_9H_9O_3NSCl_2$	-	*Chrysosporium* sp. TM9-S2
(7)	11.68	142.9903	$C_6H_5ClO_2$	114.9515 (C_4O_2Cl)	*Chrysosporium* sp. TM9-S2
(8)	12.33	339.0033	$C_{12}H_{14}Cl_2O_7$	160.9565 ($C_6H_3OCl_2$), 124.9798 (C_6H_2OCl)	*Chrysosporium* sp. TM9-S2
(9)	12.43	206.9513	$C_6H_5O_4ClS$	-	*Penicillium steckii* TM2-S5, *Aspergillus creber* TM122-S3, *Aspergillus* sp. TM124-S1
(10)	13.37	126.9945	C_6H_5OCl	-	*Penicillium steckii* TM2-S5, *Chrysosporium* sp. TM9-S2, *Aspergillus creber* TM122-S3
(11)	13.81	176.9505	$C_6H_4Cl_2O_2$	-	*Chrysosporium* sp. TM9-S2
(11)	13.94	176.9505	$C_6H_4Cl_2O_2$	-	*Chrysosporium* sp. TM9-S2
(12)	15.12	160.9565	$C_6H_4Cl_2O$	124.9798 (C_6H_2OCl); 88.9943 (C_3H_2OCl)	All

Από τα 5 στελέχη που μελετήθηκαν, ο *Chrysosporium* sp. TM9-S2 ήταν πλουσιότερος σε μεταβολίτες περιέχοντας όλες τις ενώσεις που αναφέρονται στον πίνακα εκτός από δύο, ενώ το *Penicillium* sp. TM38-S1 εμφάνισε τους λιγότερους

μεταβολίτες (μόνο δύο). Συνολικά, οι μεταβολίτες φάσης I που εντοπίστηκαν ήταν η 3,5-διχλωροκατεχόλη (ή κάποια υδροξυλιωμένη διχλωροφαινόλη) **(11)** και η 2-χλωρο-υδροκινόνη (ή 4-χλωροκατεχόλη) **(7)**, οι οποίοι βρέθηκαν μόνο στον *Chrysosporium* sp. TM9-S2. Η διχλωροκατεχόλη μεταβολίστηκε περαιτέρω στον αντίστοιχο παλμιτικό εστέρα **(4)**, τον αντίστοιχο γλυκοζίτη **(8)**, αλλά και τη συζευγμένη ένωση με γλουταμίνη **(2)**. Η χλωροϋδροκινόνη συζεύχθηκε επίσης περαιτέρω με γλουταμίνη (**1**). Ο *Chrysosporium* sp. TM9-S2 είχε τη δυνατότητα να συζεύξει τη 2,4-DCP με κυστεΐνη (**6**), ενώ οι *P. steckii* TM2-S5 και *A. creber* TM122-S3 μπορούσαν να την αφαλογονώσουν αναγωγικά παράγοντας χλωροφαινόλη (**10**). Η χλωροφαινόλη συζεύχθηκε με κυστεΐνη (**5**) από τον *Chrysosporium* sp. TM9-S2, ενώ οι *P. steckii* TM2-S5, *A. creber* TM122-S3 και *Aspergillus* sp. TM124-S1 παρήγαγαν τον αντίστοιχο θειωμένο μεταβολίτη (**9**). Ένα γεγονός που θα πρέπει να τονιστεί είναι ότι τα στελέχη *A. creber* TM122-S3 και *Aspergillus* sp. TM124-S1μπορούσαν να αποχλωριώσουν πλήρως την αρχική ένωση προς το σχηματισμό υδροξυκινόλης (**3**), η οποία μπορεί θεωρητικά να αφομοιωθεί από τα στελέχη αυτά.

4.1.2 Μηχανισμοί στελεχών TARMIC για την αποτοξικοποίηση της 2,4-DCP

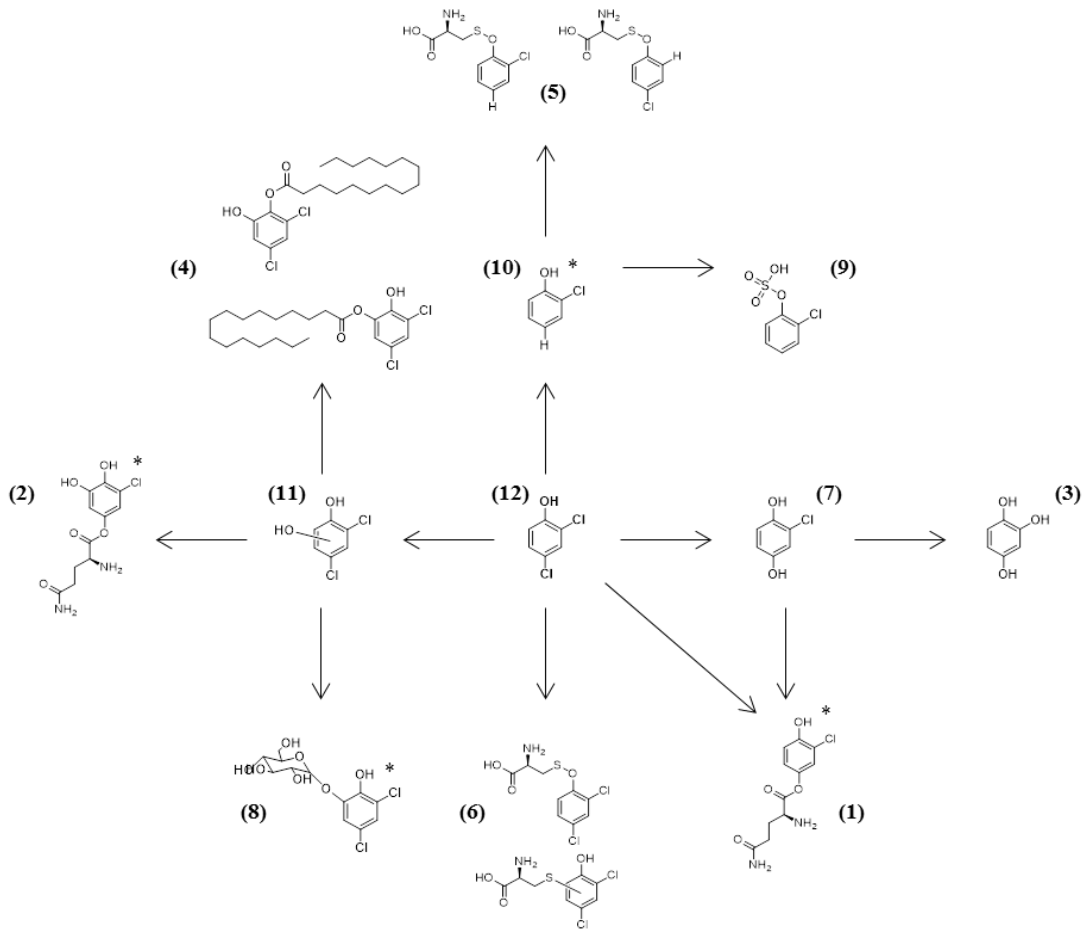
Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μύκητες αμύνονται στην παρουσία 2,4-DCP είναι πολύ λιγότερο μελετημένοι σε σύγκριση με αυτούς των βακτηρίων και επίσης φαίνεται να είναι πολύ πιο περίπλοκοι και ποικίλοι. Σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία, αυτή είναι η πρώτη φορά που ταυτοποιούνται πολλοί από τους μεταβολίτες που αναφέρονται παραπάνω. Ο μύκητας *Mortierella* sp. μπορεί να βιομετατρέψει το DCP χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές οδούς: η μία αφορούσε την αρχική υδροξυλίωση προς διχλωροκατεχόλη και την περαιτέρω μεθυλίωση προς διχλωρογουαϊακόλη, ενώ η δεύτερη περιελάμβανε την αποχλωρίωση του *παρα*-χλωρίου δίνοντας 2-χλωρο-υδροκινόνη (όπως στο *Chrysosporium* sp. TM9-S2) και την επακόλουθη αποχλωρίωση προς υδροκινόνη (Nakagawa et al., 2006). Ο μύκητας *Cunninghamella elegans* εξέφραζε ενζυμικές ενεργότητες φάσης I και φάσης II για τη βιομετατροπή ξενοβιοτικών ουσιών

συμπεριλαμβανομένων της υδροξυλάσης και της απομεθυλάσης, καθώς επίσης και των γλυκουρονοζυλο-, γλυκοζυλο- και σουλφοτρανσφερασών. Αυτός ο μύκητας μπορούσε επίσης να αποχλωριώσει το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο με τη χρήση μιας S-τρανσφεράσης γλουταθειόνης (Zhang et al., 1996). Ο ίδιος μύκητας μπορούσε να χρησιμοποιήσει τόσο οξειδωτικούς όσο και αναγωγικούς μηχανισμούς για την βιομετατροπή υποκατεστημένου ναφθαλενίου (Mountfield and Hopper, 1998). Προφανώς, ένας συνδυασμός οξειδωτικής και αναγωγικής αποχλωρίωσης μπορεί να λάβει χώρα σε αερόβιους μικροοργανισμούς, όπως στην περίπτωση του *Flavobacterium* sp. που μπορούσε να μετατρέψει την πενταχλωροφαινόλη πρώτα σε τετραχλωροϋδροκινόνη με οξειδωτική αποχλωρίωση και στη συνέχεια να έχει αφαιρέσει δύο επιπλέον άτομα χλωρίου με αναγωγική αφαλογόνωση (Steiert and Crawford, 1986). Η αναγωγική αφαλογονάση του βακτηρίου αυτού που χρησιμοποιούσε γλουταθειόνη σαν αναγωγικό παράγοντα απομονώθηκε και μελετήθηκε και φάνηκε να είναι παρόμοια με τις S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης φυτικής προέλευσης (Orser et al., 1993; Xun et al., 1992). Επιπρόσθετα, ένα στέλεχος *Trichoderma harzianum* που προέρχεται από τη θάλασσα, απομονωμένο από το ασπόνδυλο *Didemnun ligulum*, μπορεί να βιομετατρέψει την πενταχλωροφαινόλη και να παράξει πενταχλωροανισόλη και 2,3,4,6-τετραχλωροανισόλη, πράγμα που υποδηλώνει δραστικότητα αναγωγικής αφαλογονάσης (Vacondio et al., 2015). Ο μύκητας λευκής σήψης *Coriolus versicolor* ακλουθεί διαφορετικές οδούς για τον μετασχηματισμό του ζιζανιοκτόνου χλωρονιτροφένιο, συμπεριλαμβανομένων των αντιδράσεων υδροξυλίωσης, οξειδώσεως και αναγωγικής αποχλωρίωσης (Hiratsuka et al., 2001).

Πολλοί άλλοι μύκητες, ως επί το πλείστον λευκής σήψης, έχουν τη δυνατότητα να μετασχηματίζουν τη DCP και άλλες CPs με τις ισχυρές λιγνινολυτικές ενζυμικές ενεργότητες που εκφράζουν εξωκυτταρικά. Τα προϊόντα αυτών των ενζύμων κάποιες φορές είναι ακόμη πιο τοξικά από τις αρχικές ενώσεις, όπως για παράδειγμα οι χλωριωμένοι αιθέρες και διοξίνες (Öberg and Rappe, 1992; Tsujiyama et al., 2013). Οι μύκητες *Panus tigrinus* και *Coriolus versicolor* παρουσίασαν την ικανότητα να μετατρέπουν διάφορες χλωροφαινόλες συμπεριλαμβανομένης και της 2,4-DCP και της 2,4,6-TCP με την έκφραση

λιγνινολυτικών ενεργοτήτων (Leontievsky et al., 2000). Οι μυκητιακοί μεταβολίτες της TCP ταυτοποιήθηκαν ως 2,6-διχλωρο-1,4-υδροκινόλη (οξειδωτική αποχλωρίωση) και 2,6-διχλωρο-1,4-βενζοκινόνη. Ο *Phanerochaete chrysosporium* είναι ένα πολύ γνωστός λιγνινολυτικός βασιδιομύκητας λευκής σήψης με την ικανότητα να μετασχηματίζει το DCP. Όλοι οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν από αυτό το στέλεχος έχουν αναφερθεί προηγουμένως και περιλαμβάνουν τις αλογονωμένες ενώσεις 2,4-διχλωροανισόλη, 2-χλωρο-1,4-υδροκινόνη (όπως και στην παρούσα μελέτη), 2-χλωρο-1,4- βενζοκινόνη και 2-χλωρο-1,4-διμεθοξυβενζόλιο (Rubilar et al., 2008). Περαιτέρω, αρκετοί πλήρως αποχλωριωμένοι μεταβολίτες ανιχνεύθηκαν, όπως η 2,5-διμεθοξυ-1,4-υδροκινόνη, 2,5-διμεθοξυ-1,4-βενζοκινόνη, 2,5-διυδροξυ-1,4-βενζοκινόνη και 1, 2,4,5-τετραϋδροξυβενζόλιο. Στην μελέτη της απομάκρυνσης υψηλών συγκεντρώσεων της DCP με τη χρήση του *Aspergillus awamori* NRRL 3112, παρόλο που δεν ταυτοποιήθηκαν μεταβολίτες, μετρήθηκε ενεργότητα 1,2-διοξυγενάσης της κατεχόλης, υποδηλώνοντας ότι η οδός αποδόμησης είναι διαφορετική από εκείνη που περιγράφηκε παραπάνω (Stoilova et al., 2006). Στην περίπτωσή μας, οι δραστικότητες διοξυγενάσης κατεχόλης που μετρήθηκαν για όλα τα δοκιμασθέντα στελέχη ήταν πολύ χαμηλές, υπολογιζόμενες κάτω από 8 U mg^{-1} εξωκυτταρικής πρωτεΐνης.

Βάσει της προαναφερθείσας βιβλιογραφίας και της μεθοδολογίας ταυτοποίησης προσπαθήσαμε να δημιουργήσουμε μια σχηματική αναπαράσταση της μεταβολικής οδού της 2,4-DCP από τα συγκεκριμένα μυκητιακά στελέχη. Οι δομικές διαμορφώσεις που παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.1 είναι υποθετικές και βασίζονται στην πιο δυνατή διαμόρφωση σύμφωνα με τη δυναμική της ένωσης και τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία. Στην περίπτωση των ενώσεων που αντιπροσωπεύονται από δύο κορυφές με στενούς χρόνους έκλουσης στα χρωματογραφήματα, υποθέσαμε ότι υπάρχουν περισσότερα από ένα ισομερή.



Εικόνα 4.1 Προτεινόμενη μεταβολική οδός για την αποτοξικοποίηση της 2,4-DCP από τους απομονωμένους μεσόφωτους μύκητες. Τα ισομερή προτάθηκαν σύμφωνα με τα δεδομένα MS/MS και τη βιβλιογραφία. Για μεταβολίτες όπου δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με το πιο πιθανό ισομερές, ένας αστερίσκος έχει προστεθεί δίπλα στο μόριο. Ο αριθμός δίπλα σε κάθε ένωση είναι εκείνος που αντιστοιχεί στον Πίνακα 4.2.

4.2 Μελέτη του μηχανισμού αποικοδόμησης της 2,4-DCP από τη μικροβιακή βιβλιοθήκη MICLIB

Τα στελέχη που αποτελούσαν τη βιβλιοθήκη MICLIB είχαν απομονωθεί από ασπόνδυλα που είχαν συλλεχθεί από τρεις διαφορετικές περιοχές: τη δυτική Μεσόγειο Θάλασσα, την Ερυθρά Θάλασσα και τη Θάλασσα Ανταμάν. Τα ασπόνδυλα από την Ερυθρά και τη Μεσόγειο Θάλασσα είχαν συλλεχθεί από τα άνω όρια της μεσόφωτης ζώνης. Τα μη-μεσόφωτα στελέχη αποτελούνταν κυρίως από τα γένη *Penicillium* (54%) και *Aspergillus* (31%) ενώ τα μεσόφωτα στελέχη

ήταν πιο ποικίλα και εκπροσωπούνταν κυρίως από τα γένη *Aspergillus* (29%), *Penicillium* (21%) και *Aphanoascus* (21%).

Τα περισσότερα από τα 27 στελέχη που μελετήθηκαν έδειξαν σημαντική δυνατότητα μετατροπής της 2,4-DCP. Η μείωση της συγκέντρωσης της 2,4-DCP στο τέλος των αντιδράσεων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3 Ποσοστό απομάκρυνσης της 2,4-DCP από resting-cell αντιδράσεις τη 10η μέρα. Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με βάση την ITS αλληλουχία τους. Πληροφορίες σχετικές με το ασπόνδυλο και την τοποθεσία από την οποία απομονώθηκαν: Ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα (Med E), Ερυθρά Θάλασσα (Red) και θάλασσα Ανταμάν (Andaman).

Κωδικός στελέχους	**Ασπόνδυλο προέλευσης**	**Τοποθεσία**	**Βάθος (m)**	**Ταυτοποίηση στελέχους**	**% απομάκρυνση DCP**
ML119-S1	Bivalve (*Pteria aegyptiaca*)	Red	35	*Aphanoascus fulvescens*	25,4
ML123-S2	*Sponge (on to of bivalve)*	Red	35	*Cladosporium halotolerans*	21,1
ML132-S1	*Sponge*	Red	35	*Aspergillus fumigatus*	27,3
ML133-S2	*Soft coral (Sarcophyton)*	Red	35	*Cladosporium halotolerans*	9,3
ML136-S2	Bivalve (*Pteria aegyptiaca*)	Red	35	*Aspergillus* sp. *(fumigatus)*	41,4
ML147-S1	*Sponge*	Med E	47	*Aspergillus terreus*	26,9
ML147-S2	*Sponge*	Med E	47	*Aspergillus* sp. *(tereus)*	52,1
ML149-S1	*Sponge*	Med E	49	*Aphanoascus fulvescens*	41,8
ML150-S1	Sponge + Brittle stars	Med E	45	*Aphanoascus fulvescens*	35,8
ML153-S1	*Sponge*	Med E	45	*Penicillium fellutanum*	13,9
ML153-S2	*Sponge*	Med E	45	*Penicillium fellutanum*	24,7
ML155-S1	*Sponge*	Med E	35	*Lecanicillium* sp.	19,0
ML156-S8	*Sponge*	Med E	35	*Penicillium chrysogenum*	59,5
ML197-S3	*Protula intestinum*	Med E	6	*Tritirachium* sp.	66,3
ML6-S1	*Chondrilla australiensis*	Andaman	10-15	*Cladosporium* sp.	64,0
ML10-S1	*Clathria (Thalysias) reinwardti*	Andaman	10-15	*Penicillium coffeae*	37,1
ML14-S1	*Phobas arborescens*	Andaman	10-15	*Aspergillus niger*	22,9
ML15-S1	*Phobas arborescens*	Andaman	10-15	*Aspergillus terreus*	27,3
ML16-S2	*Iotrochota baculifera*	Andaman	10-15	*Penicillium chrysogenum*	37,9
ML45-S3	*Macrorhynchia philippina*	Andaman	10-15	*Penicillium chrysogenum*	27,1
ML45-S5	*Macrorhynchia philippina*	Andaman	10-15	*Penicillium steckii*	36,3

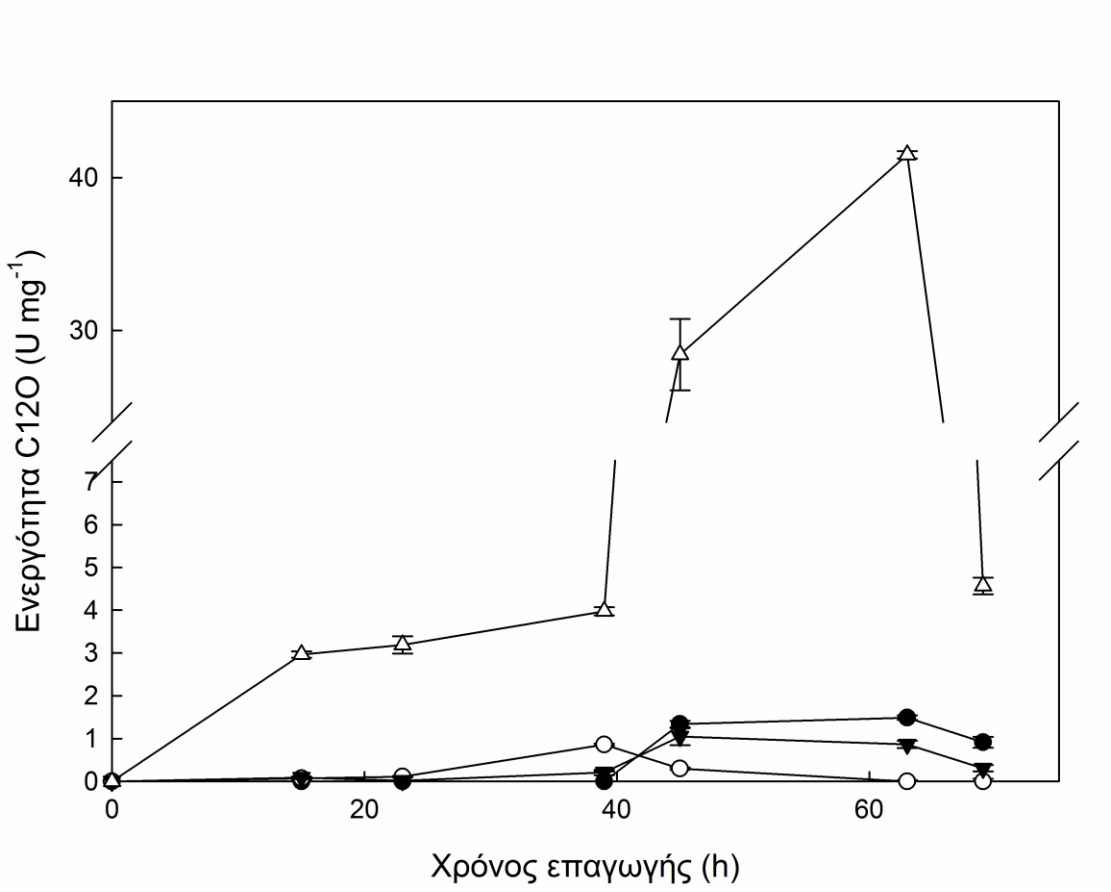
ML45-S6	*Macrorhynchia philippina*	Andaman	10-15	*Purpureocillium lilacinum*	32,8
ML52-S1	*Unknown hydroid*	Andaman	10-15	*Penicillium citrinum*	26,7
ML52-S5	*Unknown hydroid*	Andaman	10-15	*Penicillium coffeae*	26,8
ML52-S6	*Unknown hydroid*	Andaman	10-15	*Aspergillus niger*	29,3
ML52-S7	*Unknown hydroid*	Andaman	10-15	*Penicillium steckii*	31,7
ML52-S8	*Unknown hydroid*	Andaman	10-15	*Aspergillus fumigatus*	32,8

Η μέση συνολική απομάκρυνση ήταν 33% και ήταν το ίδιο για τα μεσόφωτα και μη μεσόφωτα στελέχη. Η πλειοψηφία των στελεχών (74%) μπορούσε να βιομετατρέψει τη 2,4-DCP σε ποσοστά 20-50%. Στην προηγούμενη μελέτη με τα μεσόφωτα στελέχη της TARMIC και πάλι η πλειοψηφία μπορούσε να απομακρύνει το 20-50% και η μέση απομάκρυνση ήταν παρόμοια (32%). Παρόλα αυτά, από τα 27 στελέχη μόνο 4 μπορούσαν να φτάσουν απομάκρυνση σε ποσοστά πάνω από 55%, τα: *Cladosporium* sp. ML6-S1 (64,0%), *Aspergillus* sp. ML147-S2 (55,1%), *Penicillium chrysogenum* ML156-S8 (59.5%) και *Tritirachium* sp. ML197-S3 (66,3%). Αυτά τα στελέχη φαίνεται να είναι διαφορετικά από τα αντίστοιχα της TARMIC βιβλιοθήκης (*Penicillium steckii*, *Chrysosporium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus creber* και *Aspergillus* sp.).

4.2.1 Μέτρηση εξωκυτταρικής ενεργότητας διοξυγενάσης της κατεχόλης

Εξωκυτταρικές ενεργότητες διοξυγενασών της κατεχόλης μετρήθηκαν στις καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών ύστερα από προσθήκη 2,4-DCP. Όλα τα στελέχη εξέφραζαν κυρίως ενεργότητα C12O αντί για C23O. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1.1, όλα τα στελέχη εκτός του *Aspergillus* sp ML147-S2 εμφάνισαν μέγιστο ενεργότητας στις 63 h. Επίσης, το στέλεχος *Tritirachium* sp. ML197-S3 εκφράζει μακράν την υψηλότερη ενεργότητα C12O (41.50 U mg^{-1}), 28 φορές υψηλότερη από το επόμενο στέλεχος (*Cladosporium* sp. ML6-S1). Η ενεργότητα C23O εκφραζόταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα και μόνο δύο στελέχη (*Tritirachium* sp. ML197-S3 και *Aspergillus* sp. ML147-S2) εμφάνισαν μετρήσιμη ενεργότητα στις 63 h (0,36 and 0,33 U mg^{-1} αντίστοιχα). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο μύκητας *Aspergillus awamori* NRRL 3112, ο οποίος είχε τη δυνατότητα να

μεγαλώνει παρουσία αρκετών φαινολικών ενώσεων, εξέφραζε 0,043 U mg^{-1} C12O μεγαλώνοντας σε 2,4-DCP (Stoilova et al., 2006).



Διάγραμμα 4.1 Χρονική πορεία της εξωκυτταρικής ενεργότητας 1,2-διοξυγενάσης της κατεχόλης (C12O) εκφρασμένη σε U mg^{-1} πρωτεΐνης για τα 4 επιλεγμένα στελέχη και η οποία είχε επαχθεί με 1 mM 2,4-DCP. στελέχη: *Cladosporium* sp ML6-S1 (●), *Aspergillus* sp ML147-S2 (○), *Penicillium chrysogenum* ML156-S8 (▼) και *Tritirachium* sp ML197-S3 (Δ).

Οι βακτηριακές C12O είναι πολύ καλά μελετημένα ένζυμα όσον αφορά το μηχανισμό δράσης τους, την εξειδίκευση υποστρώματος και τις τρισδιάστατες δομές τους (Guzik et al., 2013b). Οι C12O είναι γνωστό ότι εκφράζονται από διάφορους μικροοργανισμούς με δυνατότητα αποδόμησης φαινολικών ουσιών. Βακτήρια με δυνατότητα αφομοίωσης του 3-υδροξυβενζολικού οξέος (Subbotina et al., 2016), της φαινόλης (Lin and Milase, 2015), του βενζολικού οξέος (Guzik et al., 2013a) και της α-ναφθόλης (Giedraityte and Kalėdienė, 2009), εξέφραζαν τέτοια ένζυμα τα οποία και έχουν χαρακτηριστεί. Αντιθέτως, οι αναφορές σχετικά

με την έκφραση ενεργότητας C12O από μύκητες είναι ελάχιστες. Για παράδειγμα, ενεργότητα C12O επαγόμενη από φαινόλη έχει μετρηθεί σε κάποιους νηματοειδείς μύκητες (Cai et al., 2007; Santos and Linardi, 2004), αλλά η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός τέτοιων ενζύμων έχει γίνει μόνο από στελέχη *Candida* (Long et al., 2016; Tsai and Li, 2007).

4.2.2 Ταυτοποίηση μεταβολιτών της 2,4-DCP από MICLIB στελέχη

Όπως έχει ειπωθεί και παραπάνω οι γνώσεις σχετικά με τους βακτηριακούς μηχανισμούς αποτοξικοποίησης και αφομοίωσης των χλωροφαινολών είναι πολύ περισσότερες από ότι για τους μυκητιακούς μηχανισμούς. Είναι παρόλα αυτά γνωστό ότι οι μύκητες επεξεργάζονται τις ξενοβιοτικές ενώσεις με δύο βήματα, τη φάση I (προσθήκη δραστικών ομάδων) και τη φάση II (συζεύξεις) (Aranda, 2016; Marco-Urrea and Reddy, 2012).

Με βάση την ανάλυση MS, ανιχνεύθηκαν αρκετές ενώσεις, ωστόσο δόθηκε έμφαση σε αυτές που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της 2,4-DCP. Για την εύρεση πιθανών μεταβολιτών της 2,4-DCP χρησιμοποιήθηκαν διάφορα λογισμικά και ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων. Για την πρόβλεψη της στοιχειακής σύνθεσης (EC) των ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν λογισμικά όπως Sirius, Rdisop και mMass σύμφωνα με την ακριβή μάζα, τις σχετικές εντάσεις του πρώτου και του δεύτερου ισότοπου κάθε ένωσης, τους κανόνες αναλογίας των H /C , NOPS/C, RDBE και εφαρμόζοντας ανοχή m/z στα 10 ppm. Οι ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων Metlin και Chemspider καθώς και δεδομένα από τη βιβλιογραφία χρησιμοποιήθηκαν για να ταυτοποιήσουν τους μεταβολίτες, εφαρμόζοντας την επιθυμητή ανοχή m/z. Όλες οι ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως μεταβολίτες ανιχνεύθηκαν μόνο σε αντιδράσεις κυττάρων με τη 2,4-DCP. Ο Πίνακας 4.4 απεικονίζει τους μεταβολίτες αυτούς με βάση την προαναφερθείσα ανάλυση.

Πίνακας 4.4 Μεταβολίτες της 2,4-DCP που εντοπίστηκαν στις resting-cell αντιδράσεις. Rt: χρόνος έκλουσης, [M − H]-: m/z του ψευδομοριακού ιόντος, EC: στοιχειακή σύνθεση.

A/A	Rt (min)	$[M-H]^-$	EC	Μικροοργανισμός
(1)	0.89	126.9987	C_6H_5ClO	*Aspergillus* sp MLm147-S2
(2)	1.11	157.0146	$C_6H_6O_5$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(3)	1.45	287.0449	$C_{11}H_{13}O_5N_2Cl$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(3)	1.47	287.0452	$C_{11}H_{13}O_5N_2Cl$	*Tritirachium* sp MLm197-S3, *Aspergillus* sp MLm147-S2
(3)	1.50	287.0452	$C_{11}H_{13}O_5N_2Cl$	*P. chrysogenum* MLm156-S8
(4)	2.33	141.0197	$C_6H_6O_4$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(4)	2.44	141.0196	$C_6H_6O_4$	*P. chrysogenum* MLm156-S8
(4)	2.45	141.0196	$C_6H_6O_4$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(4)	2.46	141.0196	$C_6H_6O_4$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(4)	2.50	141.0196	$C_6H_6O_4$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(5)	3.15	125.0248	$C_6H_6O_3$	*Aspergillus* sp MLm147-S2
(5)	3.18	125.0249	$C_6H_6O_3$	*Aspergillus* sp MLm147-S2
(5)	3.19	125.0248	$C_6H_6O_3$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(5)	3.19	125.0248	$C_6H_6O_3$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(5)	3.20	125.0247	$C_6H_6O_3$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(5)	3.20	125.0248	$C_6H_6O_3$	*P. chrysogenum* MLm156-S8
(5)	3.22	125.0248	$C_6H_6O_3$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(5)	3.22	125.0248	$C_6H_6O_3$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(5)	3.23	125.0250	$C_6H_6O_3$	*P. chrysogenum* MLm156-S8
(5)	3.25	125.0249	$C_6H_6O_3$	*Aspergillus* sp MLm147-S2
(5)	3.27	125.0250	$C_6H_6O_3$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(5)	3.27	125.0251	$C_6H_6O_3$	*P. chrysogenum* MLm156-S8
(6)	6.93	245.9994	$C_9H_{10}NClO3S$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(7)	7.34	206.9523	$C_6H_5O_4ClS$	*Aspergillus* sp MLm147-S2
(8)	10.62	339.0041	$C_{12}H_{14}Cl_2O_7$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(8)	10.62	339.0042	$C_{12}H_{14}Cl_2O_7$	*Aspergillus* sp MLm147-S2
(8)	10.64	339.0040	$C_{12}H_{14}Cl_2O_7$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(8)	10.73	339.0041	$C_{12}H_{14}Cl_2O_7$	*Aspergillus* sp MLm147-S2
(9)	11.91	176.9517	$Cl_2C_6H_2(OH)_2$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(9)	11.92	176.9517	$Cl_2C_6H_2(OH)_2$	*Aspergillus* sp MLm147-S2
(9)	11.93	176.9518	$C_6H_4Cl_2O_2$	*P. chrysogenum* MLm156-S8
(9)	11.94	176.9517	$C_6H_4Cl_2O_2$	*Tritirachium* sp MLm197-S3

(9)	11.94	176.9517	$Cl_2C_6H_2(OH)_2$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(9)	11.96	176.9521	$C_6H_4Cl_2O_2$	*P. chrysogenum* MLm156-S8
(9)	11.96	176.9521	$C_6H_4Cl_2O_2$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(9)	12	176.9521	$C_6H_4Cl_2O_2$	*P. chrysogenum* MLm156-S8
(10)	13.46	160.9572	$C_6H_4Cl_2O$	*Aspergillus* sp MLm147-S2
(10)	13.46	160.9571	$C_6H_4Cl_2O$	Control day 10
(10)	13.47	160.9571	$C_6H_4Cl_2O$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(10)	13.48	160.9572	$C_6H_4Cl_2O$	*Aspergillus* sp MLm147-S2
(10)	13.48	160.9572	$C_6H_4Cl_2O$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(10)	13.48	160.9572	$C_6H_4Cl_2O$	*P. chrysogenum* MLm156-S8
(10)	13.49	160.9572	$C_6H_4Cl_2O$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(10)	13.50	160.9573	$C_6H_4Cl_2O$	*P. chrysogenum* MLm156-S8
(10)	13.50	160.9571	$C_6H_4Cl_2O$	*P. chrysogenum* MLm156-S8
(10)	13.51	160.9571	$C_6H_4Cl_2O$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(10)	13.51	160.9572	$C_6H_4Cl_2O$	*Tritirachium* sp MLm197-S3
(10)	13.52	160.9572	$C_6H_4Cl_2O$	Control day 6
(10)	13.52	160.9573	$C_6H_4Cl_2O$	*Aspergillus* sp MLm147-S2
(10)	13.53	160.9572	$C_6H_4Cl_2O$	*Cladosporium* sp MLm6-S1
(10)	13.55	160.9572	$C_6H_4Cl_2O$	Control day 2

Εννέα μεταβολίτες της 2,4-DCP **(10)** ταυτοποιήθηκαν, 6 από τους οποίους ήταν χλωριωμένοι. Σε δύο από τα στελέχη, το *Aspergillus* sp ML147-S2 και το *Tritirachium* sp ML197-S3, εντοπίστηκαν 6 μεταβολίτες, ενώ για τα άλλα δύο στελέχη 4 μεταβολίτες. Όλα τα στελέχη είχαν τη δυνατότητα να υδροξυλιώνουν το αρχικό μόριο προς την ένωση **(9)**, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι η 3,5-διχλωροκατεχόλη. Όλα τα στελέχη εκτός του *Aspergillus* sp ML147-S2 είχαν τη δυνατότητα να μετατρέπουν τη διχλωροκατεχόλη σε τετραϋδροξυβενζόλιο **(4)**. Επίσης, η 2,4-DCP μπορούσε να αποχλωριωθεί πλήρως από όλα τα στελέχη, σχηματίζοντας υδροξυκινόλη **(5)**. Οι προαναφερθείσες αντιδράσεις πραγματοποιούνται από ένζυμα φάσης Ι, τα οποία είναι πιθανότατα μονοοξυγενάσες. Η πλήρης αποχλωρίωση του αρχικού ρύπου είναι πολύ σημαντική, καθώς μειώνεται κατά πολύ η τοξικότητά του. Υπήρχε όμως και ένας άλλος χλωριωμένος μεταβολίτης της διχλωροκατεχόλης, η γλυκοζυλιωμένη της μορφή **(8)**. Αυτός ο μεταβολίτης εντοπίστηκε στα στελέχη *Aspergillus* sp ML147-

S2 και *Tritirachium* sp ML197-S3 και παρόλο που είναι πολύ λιγότερο λιπόφιλος από την αρχική ένωση, εξακολουθεί να περιέχει και τα δύο χλώρια και είναι πιθανότατα τελικό προϊόν που δεν μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω. Η διχλωροκατεχόλη από την άλλη, μπορούσε να αποχλωριωθεί μερικώς από όλα τα στελέχη εκτός του *Cladosporium* sp ML6-S1, προς το σχηματισμό της αντίστοιχης συζευγμένης ένωσης με γλουταμίνη **(3)**. Άλλα μερικώς αποχλωριωμένα προϊόντα που ανιχνεύθηκαν ήταν η χλωροφαινόλη **(1)** που ανιχνεύθηκε μόνο στον *Aspergillus* sp ML147-S2 και η συζευγμένη χλωροφαινόλη με θειώδες **(7)** και κυστεΐνη **(6)** που εμφανίζονται στους *Aspergillus* sp ML147-S2 και *Cladosporium* sp ML6-S1.

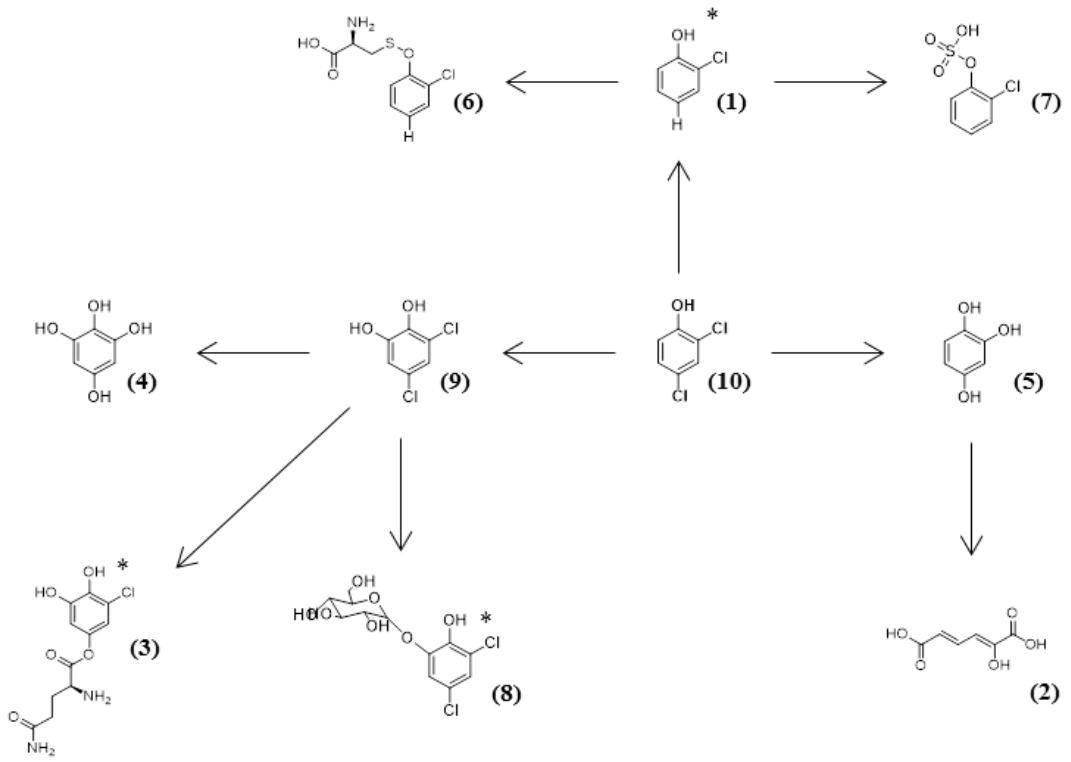
Επιπροσθέτως, στις αντιδράσεις του *Tritirachium* sp ML197-S3 εντοπίστηκε μία ένωση, η οποία θα μπορούσε να είναι το προϊόν διάσπασης του δακτυλίου της υδροξυκινόλης. Η ένωση **(2)** θα μπορούσε να είναι το 2-υδροξυμουκονικό οξύ, αν λάβουμε υπόψη την υψηλή ενεργότητα C12O που εντοπίστηκε στο συγκεκριμένο στέλεχος. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό γεγονός, καθώς υπάρχει μεγάλη πιθανότητα ένα μέρος της 2,4-DCP να μπορεί να αφομοιώνεται από το *Tritirachium* sp ML197-S3. Ο μηχανισμός αυτός αποτοξικοποίησης της 2,4-DCP έρχεται σε αντίθεση με αυτόν των βακτηρίων, τα οποία πρώτα πραγματοποιούν τη διάνοιξη του δακτυλίου και κατόπιν την αποχλωρίωση (Arora and Bae, 2014).

4.2.3 Μηχανισμοί στελεχών MICLIB για την αποτοξικοποίηση της 2,4-DCP

Στην προαναφερθείσα μελέτη με τα μεσόφωτα TARMIC στελέχη δεν εντοπίστηκαν προϊόντα διάνοιξης δακτυλίου, αλλά ούτε και ενεργότητες διοξυγενάσης. Εντοπίστηκε όμως και εκεί υδροξυκινόλη, η οποία ήταν ο μόνος πλήρως αποχλωριωμένος μεταβολίτης. Επίσης, οι μεταβολίτες της βιβλιοθήκης TARMIC είχαν μεγαλύτερη ποικιλία σε σχέση με αυτούς της MICLIB. Παρόλα αυτά κάποιοι ήταν κοινοί και για τις δύο μελέτες όπως: η διχλωροκατεχόλη, ο γλυκοζίτης της και η σύζευξή της με γλουταμίνη, καθώς επίσης και η χλωροφαινόλη, και η σύζευξή της με θειώδες και την κυστεΐνη. Τα στελέχη του γένους *Aspergillus* και των δύο μελετών (*Aspergillus* sp ML147-S2, *Aspergillus*

creber TM122-S3 and *Aspergillus* sp. TM124-S1) είχαν μόνο δύο κοινούς μεταβολίτες. Από την άλλη, το *Penicillium chrysogenum* ML156-S8 είχε μόνο ένα κοινό μεταβολίτη με το *Penicillium* sp TM38-S1.

Βασισμένοι στη βιβλιογραφία και τα MS αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού του μεταβολικού μονοπατιού της 2,4-DCP που ακολουθείται από τα μελετώμενα μυκητιακά στελέχη. Οι δομές των ενώσεων που παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.2 είναι υποθετικές και βασίζονται στην πιο πιθανή διαμόρφωση σύμφωνα και προηγούμενες μελέτες.



Εικόνα 4.2 Προτεινόμενη μεταβολική οδός για την αποτοξικοποίηση της 2,4-DCP από τους απομονωμένους μύκητες. Τα ισομερή προτάθηκαν σύμφωνα με τα δεδομένα MS και τη βιβλιογραφία. Για μεταβολίτες όπου δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με το πιο πιθανό ισομερές, ένας αστερίσκος έχει προστεθεί δίπλα στο μόριο. Ο αριθμός δίπλα σε κάθε ένωση είναι εκείνος που αντιστοιχεί στον Πίνακα 4.4.

5 Μελέτη του δυναμικού απομάκρυνσης του PCB29 των θαλάσσιων μυκητιακών στελεχών

Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, τα PCBs ανήκουν στους έμμονους οργανικούς ρύπους και είναι ενώσεις με έντονη λιποφιλικότητα και τοξικότητα για τους ζώντες οργανισμούς. Η βιοεξυγίανση των περιοχών που είναι μολυσμένες με PCBs έχει προταθεί σαν μια βιώσιμη λύση. Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν την βιοεξυγίανση των PCBs μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση βακτηρίων. Τα αναερόβια μικρόβια χρησιμοποιούν αναγωγική αποχλωρίωση για τη μείωση του αριθμού των ατόμων χλωρίου, ενώ η αερόβια οξείδωση επιτυγχάνεται με την προσθήκη οξυγόνου στο δακτύλιο του διφαινυλίου.

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν την βιοεξυγίανση των PCBs έχουν πραγματοποιηθεί για αναερόβια βακτήρια. Τα βακτήρια αυτά επιτίθενται στους υποκαταστάτες χλωρίου στο μόριο του διφαινυλίου στην παρα- ή μετα- θέση, αντικαθιστώντας τα με υδρογόνο. Ο αριθμός των βακτηρίων που έχουν αυτή τη δυνατότητα είναι πολύ μικρός και η διεργασία την οποία επιτελούν μετατρέπει τα υψηλά χλωριωμένα PCBs σε λιγότερο χλωριωμένα τα οποία στη συνέχεια μπορούν να μετατραπούν περαιτέρω με αερόβιες διεργασίες.

Η κύρια προσέγγιση για την ενίσχυση της αερόβιας αποικοδόμησης των PCBs πραγματοποιείται μέσω της προσθήκης οξυγόνου, συν-υποστρωμάτων, επαγωγέων και επιφανειοδραστικών ουσιών (Wang et al., 2016). Το διφαινύλιο, η κύρια ένωση που στηρίζει τον συμεταβολισμό των PCB, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ενίσχυση της αερόβιας αποικοδόμησης μολυσμένου από PCB εδάφους (Chang et al., 2013). Κατά την αερόβια αποικοδόμηση, η οξειδωτική μετατροπή των PCB λαμβάνει χώρα με τη συμμετοχή αρκετών γονιδίων και των αντίστοιχων ενζύμων τους όπως δεϋδρογονάσες, διοξυγενάσες, υδρολάσες και αλδολάσες. Αυτά είναι τα κύρια ένζυμα που είναι απαραίτητα για την αποικοδόμηση των PCB από αερόβια βακτήρια, τα οποία αρχικά μετατρέπουν το PCB σε χλωρο-βενζολικό οξύ (J. K. Sharma et al., 2018). Το χλωρο-βενζολικό

οξύ στη συνέχεια μετατρέπεται σε λιγότερο τοξικά προϊόντα, ειδικά στην περίπτωση των λιγότερο χλωριωμένων PCBs.

Ιδανικά προτείνεται συνδυασμός αναερόβιας και αερόβιας βιοαποικοδόμισης των έντονα υποκατεστημένων PCBs. Αρχικά δρουν οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί, μειώνοντας τον αριθμό των χλωρίων στη δομή του διφαινυλίου και στη συνέχεια πάνω στα προϊόντα αυτά να δρουν οι αερόβιοι μικροοργανισμοί για την πλήρη αποχλωρίωση και αφομοίωση του ρύπου (Passatore et al., 2014).

Στην παρούσα μελέτη οι δύο βιβλιοθήκες μικροοργανισμών που μελετήθηκαν για τη δυνατότητα απομάκρυνσης του 2,4-DCP, μελετήθηκαν επίσης και για την απομάκρυνση του έμμονου οργανικού ρύπου PCB29. Η αρχική συγκέντρωση του PCB29 στις αντιδράσεις ήταν περίπου 1 μM, όσο ήταν δηλαδή και η διαλυτότητά του στο νερό.

5.1 Απομάκρυνση PCB29 από θαλάσσιους μύκητες

Στον Πίνακα 5.1 παρουσιάζονται τα ποσοστά απομάκρυνσης του PCB29 για τα στελέχη της βιβλιοθήκης TARMIC που είχαν τη δυνατότητα απομάκρυνσης του PCB29.

Πίνακας 5.1 Ποσοστό απομάκρυνσης του PCB29 από τα απομονωμένα στελέχη της βιβλιοθήκης TARMIC ύστερα από 10 ημέρες.

Κωδικός	**Στέλεχος**	**% απομάκρυνση PCB29**	**Κωδικός**	**Στέλεχος**	**% απομάκρυνση PCB29**
TM2-S5	*Penicillium steckii*	98.3	TM30-S1	*Penicillium fellutanum*	66.4
TM6-S1	*Aspergillus tubingensis*	87.6	TM220-S1	*Cladosporium sphaerospermum*	81.9
TM6-S2	*Penicillium kewense*	94.0	TM220-S4	*Penicillium* sp.	72.4
TM37-S2	*Penicillium*	95.6	TM225-S2	*Penicillium*	90.7

	chrysogenum			*chrysogenum*	
TM38-S1	*Penicillium* sp.	49.9	TM226-S1	*Cladosporium halotolerans*	97.8
TM9-S2	*Chrysosporium* sp.	97.1	TM226-S2	*Penicillium chrysogenum*	78.9
TM43-S1	*Penicillium* sp.	92.5	TM230-S1	*Penicillium* sp.	77.8
TM43-S3	*Cladosporium halotolerans*	94.8	TM237-S5	*Chrysosporium lobatum*	54.4
TM46-S1	*Cladosporium* sp.	94.5	TM242-S1	*Penicillium chrysogenum*	58.9
TM47-S1	*Cladosporium halotolerans*	98.1	TM53-S1	*Cladosporium* sp.	89.3
TM116-S2	*Aspergillus* sp.	69.5	TM58-S1	*Penicillium* sp.	94.1
TM116-S3	*Hortaea* sp.	91.7	TM58-S2	*Aspergillus niger*	60.9
TM122-S1	*Aspergillus puulaauensis*	93.6	TM65-S2	*Pseudocercospore lla* sp.	87.6
TM122-S2	*Aspergillus* sp.	99.3	TM65-S3	*Aspergillus fumigatus*	87.1
TM124-S1	*Aspergillus* sp.	96.5	TM65-S4	*Acremonium* sp.	93.7
TM125-S2	*Penicillium* sp.	95.6	TM75-S1	*Aspergillus* sp.	94.3
TM125-S3	*Penicillium* sp.	99.0	TM122-S4	*Obolarina* sp.	11.4
TM126-S1	*Aspergillus* sp.	97.6	TM124-S4	*Aspergillus* sp.	92.0
TM133-S2	*Penicillium crustosum*	41.0	TM132-S1	*Aspergillus* sp.	66.2
TM138-S1	*Purpureocillium lilacinum*	98.2	TM139-S3	*Penicillium polonicum*	93.5
TM138-S3	*Cladosporium* sp.	99.3	TM141-S1	*Alternaria* sp.	98.6
TM138-S4	*Purpureocillium lilacinum*	98.6	TM141-S3	*Alternaria* sp.	81.4
TM7-S1	*Penicillium* sp.	15.5	TM148-S1	*Aspergillus* sp.	31.2

Σαράντα έξι στελέχη από τη βιβλιοθήκη TARMIC είχαν τη δυνατότητα βιομετατροπής του PCB29. Ο μέσος όρος απομάκρυνσης του ρύπου ήταν 82%,

ενώ η πλειοψηφία των μυκητιακών στελεχών (57%) είχε τη δυνατότητα να μετατρέπει το ρύπο σε ποσοστά πάνω από 90%. Τα στελέχη αυτά ανήκαν κυρίως στα γένη *Penicillium* (35%), *Aspergillus* (23%) και *Cladosporium* (19%), ενώ υπήρχαν και εκπρόσωποι από τα γένη *Purpureocillium*, *Chrysosporium*, *Hortaea*, *Acremonium* και *Altenaria*.

Μάλιστα πέντε στελέχη μπόρεσαν να απομακρύνουν σχεδόν πλήρως το ρύπο, σε ποσοστά πάνω από 98.5% και ήταν τα εξής: *Aspergillus* sp. TM122-S2, *Penicillium* sp. TM125-S3, *Cladosporium* sp. TM138-S3, *Purpureocillium lilacinum* TM138-S4 και *Alternaria* sp. TM141-S1. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τα στελέχη αυτά, το *Penicillium* sp. TM125-S3 έδειξε και μεγάλη δυνατότητα απομάκρυνσης του 2,4-DCP (50,2%).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα στελέχη της βιβλιοθήκης MICLIB (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 5.2 Ποσοστό απομάκρυνσης του PCB29 από τα απομονωμένα στελέχη της βιβλιοθήκης MICLIB ύστερα από 10 ημέρες.

Κωδικός	**Στέλεχος**	**% απομάκρυνση PCB**
ML119-S1	*Aphanoascus fulvescens*	60.4
ML123-S2	*Cladosporium halotolerans*	87.1
ML133-S1	*Aspergillus fumigatus*	86.7
ML133-S2	*Cladosporium halotolerans*	61.1
ML136-S2	*Aspergillus* sp. *(fumigatus)*	99.7
ML138-S2	*Aspergillus fumigatus*	99.8
ML147-S1	*Aspergillus terreus*	91.3
ML147-S2	*Aspergillus* sp. *(tereus)*	85.1
ML149-S1	*Aphanoascus fulvescens*	42.9
ML150-S1	*Aphanoascus fulvescens*	83.6
ML153-S1	*Penicillium fellutanum*	41.1

ML153-S2	*Penicillium fellutanum*	53.8
ML155-S1	*Lecanicillium* sp	26.8
ML156-S8	*Penicillium chrysogenum*	92.3
ML197-S3	*Tritirachium* sp.	87.6
ML6-S1	*Cladosporium* sp.	97.2
ML10-S1	*Penicillium coffeae*	43.1
ML14-S1	*Aspergillus niger*	69.0
ML15-S1	*Aspergillus terreus*	50.8
ML45-S3	*Penicillium chrysogenum*	34.7
ML45-S5	*Penicillium steckii*	67.1
ML45-S6	*Purpureocillium lilacinum*	1.0
ML52-S7	*Penicillium steckii*	0.5
ML52-S8	*Aspergillus fumigatus*	97.9
ML53-S3	*Penicillium steckii*	98.8
ML53-S5	*Penicillium citrinum*	97.8

Είκοσι έξι στελέχη από τη βιβλιοθήκη MICLIB είχαν τη δυνατότητα βιομετατροπής του PCB29. Ο μέσος όρος απομάκρυνσης του ρύπου ήταν 68%, ποσοστό το οποίο είναι αρκετά χαμηλότερο από το αντίστοιχο της TARMIC βιβλιοθήκης. Η TARMIC βιβλιοθήκη αποτελείται αποκλειστικά από μεσόφωτα στελέχη, ενώ η MICLIB από συνδυασμό μεσόφωτων και στελεχών από ρηχά νερά. Αν δούμε τα ποσοστά ξεχωριστά για τις δύο κατηγορίες μικροοργανισμών παρατηρείται ότι και εδώ τα ποσοστά απομάκρυνσης του ρύπου από τα μεσόφωτα στελέχη είναι υψηλότερα (72% έναντι 62%). Η διαφοροποίηση αυτή δεν είχε φανεί κατά τη μελέτη απομάκρυνσης του 2,4-DCP.

Στην περίπτωση της MICLIB, μόνο το 31% των στελεχών είχε τη δυνατότητα να μετατρέπει το ρύπο σε ποσοστά πάνω από 90%. Τα στελέχη αυτά ανήκαν κυρίως στα γένη *Aspergillus* (50%), *Penicillium* (38%) και *Cladosporium* (12%). Τα στελέχη των γενών αυτών φαίνεται πως και στις δύο περιπτώσεις είναι τα πιο ικανά για τη βιομετατροπή του PCB29. Τρία στελέχη της MICLIB έδωσαν

ποσοστά πάνω από 98,5% και ήταν τα εξής: *Aspergillus* sp. ML136-S2, *Aspergillus fumigatus* ML138-S2 και *Penicillium steckii* MLm53-S3. Παραδόξως, το ένα από τα τρία αυτά στελέχη προερχόταν από τη μεσόφωτη ζώνη.

Είναι εμφανές ότι τα μυκητιακά στελέχη είναι πιο αποτελεσματικά στη βιομετατροπή του PCB29, σε σύγκριση με την απομάκρυνση της 2,4-DCP. Πράγματι, ενώ μόλις λίγα στελέχη κατάφεραν να μετατρέψουν πάνω από το 50% της 2,4-DCP εντός 10 ημερών, πολλά στελέχη μπόρεσαν να βιομετατρέψουν το PCB29 σε ποσοστά άνω του 80%, ενώ αρκετά στελέχη αποδείχθηκαν ικανά να το απομακρύνουν σχεδόν εξ ολοκλήρου (>98%). Αυτό φαίνεται κάπως παράδοξο, καθώς το PCB29 είναι πιο ανθεκτικό μόριο από τη 2,4-DCP. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η αρχική συγκέντρωση της 2,4-DCP ήταν 1 mM, η οποία είναι 1000 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με αυτήν του PCB 29 (0,97 μM). Επομένως, η σχετικά υψηλή συγκέντρωση της 2,4-DCP μπορεί να έχει επηρεάσει σε κάποιο βαθμό τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν και την αποτελεσματικότητα της βιοαποικοδόμησης, λόγω της τοξικότητας της.

Οι (Mouhamadou et al., 2013) απομόνωσαν μυκητιακά στελέχη από έδαφος έντονα μολυσμένο με PCBs, τα οποία ανήκαν σε τελείως διαφορετικά γένη από ότι τα θαλάσσια της παρούσας εργασίας. Οι μύκητες αυτοί απομάκρυναν μίγμα αποτελούμενο από 7 PCBs σε ποσοστά από 29-85% ύστερα από 7 ημέρες. Τα στελέχη που έδειξαν απομάκρυνση πάνω από 70% ήταν 3 *Doratomyces*, 1 *Myceliophthora*, 1 *Phoma* και 1 *Thermoascus*.

Ο ευρέως μελετημένος μύκητας *Phanerochaete chrysosporium* μπόρεσε να μειώσει τη συγκέντρωση των μιγμάτων PCB Aroclor 1242, 1254 και 1260. Επιπρόσθετα, τα PCBs με λιγότερες υποκαταστάσεις ήταν πιο εύκολο να απομακρυνθούν (J. K. Sharma et al., 2018). Η ιδιότητα των μυκήτων αυτών για την αποικοδόμηση χαμηλών συγκεντρώσεων PCBs έχει αποδειχθεί για διάφορα στελέχη (Kamei et al., 2006).

Λόγω των υψηλών οξειδοαναγωγικών δυναμικών των έντονα υποκατεστημένων PCBs, αυτά καθίστανται πιο ανθεκτικά στην αερόβια μετατροπή. Τα PCB με λιγότερα από 4 άτομα χλωρίου στο μόριό τους (όπως το

PCB29) μπορούν να αποδομηθούν σταδιακά με την έκφραση ενζύμων του καταβολισμού των διφαινυλίων. Αυτό το καταβολικό μονοπάτι τεσσάρων σταδίων υπάρχει σε κάποια αερόβια βακτήρια όπως για παράδειγμα στα *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Comamonas*, *Ralstonia*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* και *Bacillus*, και κατά το οποίο το διφαινύλιο μετατρέπεται σε βενζολικό οξύ και δύο μόρια υδρόξυ-πεντα-2,3-διενοϊκού οξέος, τα οποία μπορούν να μεταβολιστούν περαιτέρω σε CO_2, H_2O, ενώ παράγεται και βιομάζα (Fusi et al., 2017; J. K. Sharma et al., 2018) (Fusi et al., 2017).

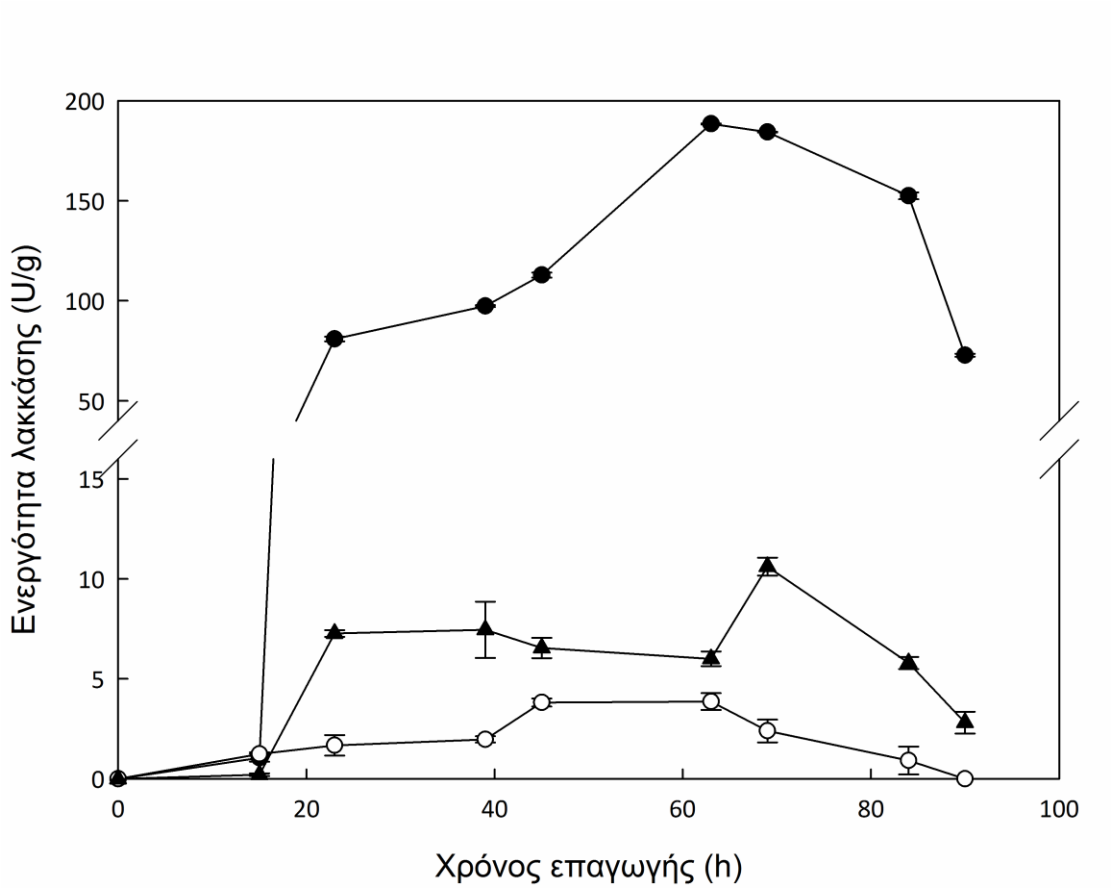
Οι μύκητες λευκής σήψης από την άλλη μεριά, χρησιμοποιούν το οξειδωτικό εξωκυτταρικό ενζυμικό τους σύστημα για να αμύνονται σε διαφορετικά ξενοβιοτικά όπως οι διοξίνες, τα PAHs, το τρινιτροτολουένιο, βαφές, παρασιτοκτόνα, αλλά και τα PCBs. Το σύστημα αυτό αποτελείται από λιγνινάσες (ένζυμα που αποικοδομούν τη λιγνίνη), οι οποίες είναι μη ειδικές και αποτελούνται από τις οικογένειες των υπεροξειδασών και των λακκασών. Σε πολλές περιπτώσεις, για την ενεργοποίηση των μηχανισμών αποικοδόμησης των ρύπων αυτών απαιτείται περιορισμός των πηγών άνθρακα και αζώτου του μικροοργανισμού (J. K. Sharma et al., 2018).

Στην περίπτωση μας, επιχειρήθηκε ο εντοπισμός των μεταβολιτών του PCB29 χρησιμοποιώντας ανάλυση GC-MS/MS, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.6.2 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Ο εντοπισμός μεταβολιτών κατέστη αδύνατος με την συγκεκριμένη μεθοδολογία στα εκχυλίσματα των αντιδράσεων. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών ήταν χαμηλότερες από το όριο ανιχνευσιμότητας του οργάνου.

5.2 Μέτρηση ενεργότητας λακκάσης

Πέντε από τα στελέχη που ήταν πιο αποδοτικά στην απομάκρυνση PCB29 υποβλήθηκαν σε διαδικασία διαλογής αναφορικά με τη δυνατότητά τους στην παραγωγή λακκάσης παρουσία του ρύπου PCB29 συγκέντρωσης 19 μM. Στο Διάγραμμα 5.1 παρουσιάζεται η ενεργότητα λακκάσης (U g^{-1} πρωτεΐνης) συναρτήσει του χρόνου για τα στελέχη που έδωσαν μετρήσιμες τιμές ενεργότητας.

Τα στελέχη αυτά ήταν *Cladosporium* sp. TM138-S3, *Purpureocillium lilacinum* TM138-S4 και *Alternaria* sp. TM141-S1.



Διάγραμμα 5.1 Έκφραση ενεργότητας λακκάσης κατά την απομάκρυνση του PCB29 από τους επιλεγμένους μύκητες: *Cladosporium* sp. TM138-S3 (●), *Purpureocillium lilacinum* TM138-S4 (○) και *Alternaria* sp. TM141-S1 (▲).

Το στέλεχος *Cladosporium* sp. TM138-S3 εμφανίζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα λακκάσης φτάνοντας τα 188,4 U/g πρωτεΐνης ενώ η ενεργότητα στα δείγματα των στελεχών *Purpureocillium lilacinum* TM138-S4 και *Alternaria* sp. TM141-S1δεν ξεπερνάει τα 3,9 και 10,6 U/g πρωτεΐνης αντίστοιχα. Το μέγιστο της ενεργότητας για όλα τα στελέχη παρατηρήθηκε κατά την 3^{η} ημέρα επαγωγής.

Η διαλογή μικροοργανισμών θαλάσσιας προέλευσης για την έκφραση και απομόνωση ενζύμων με καινοτόμες ιδιότητες που μπορούν να αξιοποιηθούν σε διεργασίες βιοεξυγίανσης αποτελεί διαδεδομένη ερευνητική μέθοδο και βασίζεται στη βιοχημική ποικιλομορφία αυτών των μικροοργανισμών (Batista-garcía et al.,

2017; Lima and Porto, 2016; Nikolaivits et al., 2017; Theerachat et al., 2018). Η διαλογή αποτέλεσε μια διαδικασία ανάδειξης του μικροοργανισμού με τη μεγαλύτερη έκφραση λακκάσης και η παραγωγή λακκάσης μελετήθηκε στις υγρές καλλιέργειες των μικροοργανισμών παρουσία του ρύπου PCB29. Αντίστοιχα έχουν πραγματοποιηθεί ερευνητικές εργασίες διαλογής σε μύκητες που έχουν παρουσιάσει δυνατότητα αποχρωματισμού και αποικοδόμησης βαφών για την απομόνωση των λακκασών τους (Dhouib et al., 2005; Kiiskinen et al., 2004).

6 Ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων θαλάσσιας προέλευσης με πιθανές εφαρμογές στη βιοεξυγίανση

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενα κεφάλαια, τα θαλάσσια οικοσυστήματα παρουσιάζουν πολύ πλούσια βιοποικιλότητα και μόνο ένα μικρό μέρος αυτής έχει μελετηθεί. Ιδιαίτερα, αν αναφερόμαστε στην κατηγορία των μυκητιακών συμβιωτών των θαλάσσιων ασπόνδυλων και ειδικότερα μεσόφωτων ασπόνδυλων, οι γνώσεις που έχουμε είναι πολύ περιορισμένες. Έχοντας ήδη ανακαλύψει τέτοιους μικροοργανισμούς, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να απομακρύνουν χλωριωμένους οργανικούς ρύπους με διαφορετικούς μηχανισμούς, θελήσαμε να απομονώσουμε και να μελετήσουμε ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτές τις μεταβολικές διεργασίες.

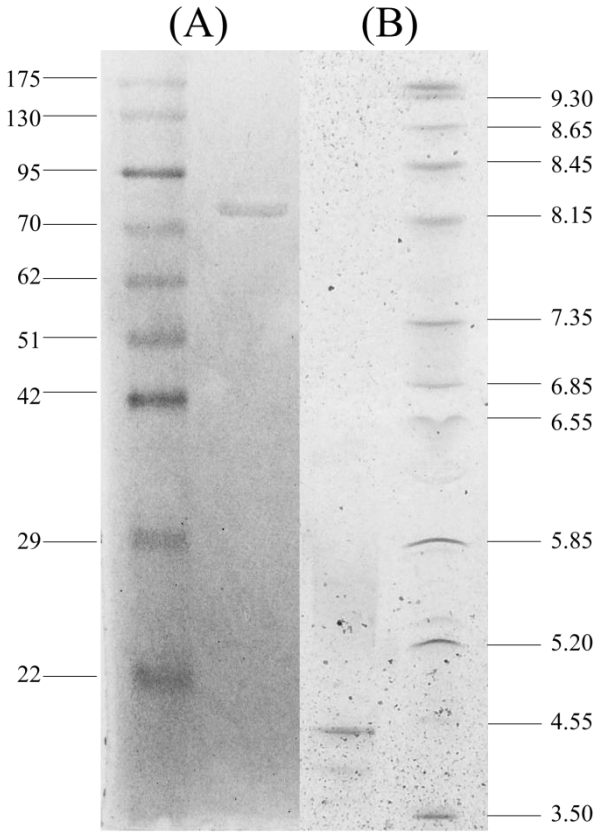
Κατά την αποικοδόμηση του 2,4-DCP, ένα μυκητιακό στέλεχος φάνηκε να εκφράζει υψηλή ενεργότητα 1,2-διοξυγενάσης της κατεχόλης (C12O), η οποία συμμετέχει στη διάνοιξη του δακτυλίου ύστερα από την αποχλωρίωσή του. Από την άλλη, στα στελέχη που απομάκρυναν το PCB29, υπήρχε ένα το οποίο εξέφραζε υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης σε σχέση με τα άλλα, η οποία εμπλέκεται είτε στην αποχλωρίωση του ρύπου ή/και στον πολυμερισμό και την καταβύθισή του. Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η απομόνωση των ενζυμικών αυτών ενεργοτήτων και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός τους.

6.1 Απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός μιας C12O του μύκητα *Tritirachium* sp. ML197-S3

6.1.1 Απομόνωση ενεργότητας C21O με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής

Η πρωτεΐνη απομονώθηκε από το εξωκυτταρικό της καλλιέργειας του μύκητα ύστερα από 3 ημέρες επαγωγή με 2,4-DCP. Το εξωκυτταρικό υγρό φιλτραρίστηκε, συμπυκνώθηκε και εξισορροπήθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα της στήλης ιοντοεναλλαγής. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl. Η συγκέντρωση NaCl στην οποία τελικά εκλούστηκε η

πρωτεΐνη ήταν 1 M. Τα κλάσματα με ενεργότητα C12O συμπυκνώθηκαν και η καθαρότητα καθώς και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-PAGE (Εικόνα 6.1A) στα ~77 kDa, ενώ το ισοηλεκτρικό της σημείο στο pH 4,5 (Εικόνα 6.1B).



Εικόνα 6.1 Ηλεκτροφόρηση (A) SDS-PAGE και (B) IEF (isoelectic focusing) για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και του ισοηλεκτρικού σημείου της απομονωμένης πρωτεΐνης.

Οι περισσότερες C12O έχουν απομονωθεί ως εσωκυτταρικά ένζυμα (Caglio et al., 2009; Guzik et al., 2013b; Nadaf and Ghosh, 2011; Tsai and Li, 2007; Wang et al., 2006) σε αντίθεση με τη συγκεκριμένη. Ένα άλλο ιδιαίτερο στοιχείο είναι ότι η απομόνωση της συγκεκριμένης διοξυγενάσης πραγματοποιήθηκε σε ένα μόνο στάδιο καθαρισμού. Αυτό είναι αρκετά σπάνιο και πιθανότατα στο γεγονός αυτό έχει συντελέσει η θαλάσσια προέλευση του ενζύμου. Το γεγονός ότι η απομόνωση πραγματοποιήθηκε σε ένα μόνο βήμα αυξάνει την ποσοστιαία ανάκτηση της

ενζυμικής ενεργότητας μετά από τις διαδικασίες καθαρισμού της (70,7%). Η διαδικασία απομόνωση μιας C12O από ένα στέλεχος *Rhodococcus* που πραγματοποιήθηκε επίσης σε ένα στάδιο είχε ανάκτηση ίση με 45% (Nadaf and Ghosh, 2011). Αντίθετα, σε διαδικασίες ανάκτησης πολλών βημάτων, το ποσοστό ανάκτησης μειώνεται και μπορεί να φτάσει έως πολύ χαμηλές τιμές, όπως 8,4% (Matsumura et al., 2004) ή 2,7% (Murakami et al., 1998).

Τα μοριακά βάρη των χαρακτηρισμένων C12O ή ομόλογων ενζύμων κυμαίνονται μεταξύ 32-39 kDa και στις περισσότερες περιπτώσεις εκφράζονται ως ομοδιμερή. Πιο συγκεκριμένα οι 2 μυκητιακές C12O από *Candida* που έχουν χαρακτηριστεί έχουν μοριακό βάρος 32 kDa (Long et al., 2016; Tsai and Li, 2007). Η μεγάλη αυτή απόκλιση είναι αρκετά περίεργη και χρήζει διερεύνησης.

6.2 Πρωτεομική και φασματομετρική ανάλυση της απομονωμένης πρωτεΐνης – Προσδιορισμός καινοτόμου δράσης ενζύμου

Τα ολιγομερή της απομονωμένης πρωτεΐνης ύστερα από υδρόλυση με τριψίνη, αναλύθηκαν με τη χρήση nanoLCMS και ύστερα έγινε προσπάθεια ανασύστασης της αλληλουχίας της πρωτεΐνης μέσω του λογισμικού Mascot. Το λογισμικό αυτό χρησιμοποιεί ως βάση δεδομένων όλες τις καταχωρημένες αλληλουχίες πρωτεϊνών και προσπαθεί να προσαρμόσει τα ταυτοποιημένα πεπτίδια πάνω σε αυτές (Karpievitch et al., 2010). Τα αποτελέσματα της αναζήτησης του Mascot φαίνονται στην Εικόνα 6.2A. Η ομοιότητα της απομονωμένης πρωτεΐνης με τις ήδη γνωστές ήταν πολύ χαμηλή. Τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε μία καταλάση του μύκητα *Colletotrichum fioriniae* PJ7 (78 kDa) με την οποία η πρωτεΐνη μας είχε επικάλυψη 8% (Εικόνα 6.2B). Οι καταλάσες όπως είναι γνωστό καταλύουν τη μετατροπή δύο μορίων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε δύο μόρια νερού και ένα μόριο οξυγόνου.

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results (A)

```
User                    : Orbitrap
Email                   : orbi@pfa
Search title            : 17K202 Labsupply
MS data file            : LTQ_17K202_Labsupply.mgf
Database                : NCBInr 20160721 (90971994 sequences; 33504913701 residues)
Taxonomy                : Fungi (5768003 sequences)
Timestamp               : 14 Nov 2017 at 07:59:33 GMT
Warning                 : Failed to initialise cache file (../data/cache/2017/11/47ejmrc5pw6tiynvhfbyj7ouma/F005301.dat.
-3
Enzyme                  : Trypsin
Fixed modifications     : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications  : Deamidated (NQ),Oxidation (M)
Mass values             : Monoisotopic
Protein Mass            : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance  : ± 3 ppm
Fragment Mass Tolerance: ± 0.6 Da
Max Missed Cleavages    : 2
Instrument type         : ESI-TRAP
Number of queries       : 2409
Protein hits            : gi|589114107  predicted protein [Trichoderma reesei QM6a]
                          gi|729189917  Putative Alkaline phosphatase [Torrubiella hemipterigena]
                          gi|615462389  catalase [Colletotrichum fioriniae PJ7]
                          gi|1024758500 protein tyrosine phosphatase [Aschersonia aleyrodis RCEF 2490]
                          gi|631235176  putative catalase-3 protein [Phaeoacremonium minimum UCRPA7]
                          gi|632911551  catalase [Ustilaginoidea virens]
                          gi|302910872  predicted protein [Nectria haematococca mpVI 77-13-4]
                          gi|1025667548 catalase [Isaria fumosorosea ARSEF 2679]
                          gi|302406562  catalase-3 [Verticillium alfalfae VaMs.102]
                          gi|629731239  Beta-N-acetylglucosaminidase [Metarhizium robertsii ARSEF 23]
                          gi|629689521  catalase [Metarhizium acridum CQMa 102]
                          gi|1032871178 Beta-N-acetylhexosaminidase [Purpureocillium lilacinum]
                          gi|330926609  hypothetical protein PTT_13058 [Pyrenophora teres f. teres 0-1]
                          gi|1024748077 catalase [Ascosphaera apis ARSEF 7405]
                          gi|557725587  catalase R [Byssochlamys spectabilis No. 5]
                          gi|1022630753 hypothetical protein PV10_04319 [Exophiala mesophila]
                          gi|361129275  hypothetical protein M7I_2880 [Glarea lozoyensis 74030]
                          gi|171684547  hypothetical protein [Podospora anserina S mat+]
                          gi|315041509  dipeptidyl aminopeptidase B [Microsporum gypseum CBS 118893]
                          gi|115384982  hypothetical protein ATEG_01673 [Aspergillus terreus NIH2624]
                          gi|589269434  hypothetical protein TREMEDRAFT_20784, partial [Tremella mesenterica DSM 1558]
                          gi|821506661  hypothetical protein EMCG_02272 [Emmonsia crescens UAMH 3008]
                          gi|50291715   hypothetical protein [Candida glabrata CBS 138]
                          gi|1024095813 hypothetical protein EXIGLDRAFT_752363 [Exidia glandulosa HHB12029]
                          gi|646397937  hypothetical protein JAAARDRAFT_76104 [Jaapia argillacea MUCL 33604]
                          gi|530480308  hypothetical protein CGLO_00294 [Colletotrichum gloeosporioides Cg-14]
                          gi|255945805  Pc20g11840 [Penicillium rubens Wisconsin 54-1255]
                          gi|924121711  Oxygen-dependent choline dehydrogenase [Rhizoctonia solani]
                          gi|685870701  hypothetical protein FPSE_10991 [Fusarium pseudograminearum CS3096]
                          gi|751056497  hypothetical protein PAXRUDRAFT_624614 [Paxillus rubicundulus Ve08.2h10]
                          gi|631245319  putative glucoamylase p protein [Phaeoacremonium minimum UCRPA7]
                          gi|924116065  hypothetical protein RSOLAG22IIIB_02076 [Rhizoctonia solani]
                          gi|169844201  hypothetical protein CCIG_06808 [Coprinopsis cinerea okayama7#130]
                          gi|342879422  hypothetical protein FOXB_08811 [Fusarium oxysporum Fo5176]
                          gi|729180750  Putative Catalase/peroxidase HPI [Torrubiella hemipterigena]
                          gi|831345077  ornithine-oxo-acid transaminase [Pseudogymnoascus destructans 20631-21]
                          gi|751012218  hypothetical protein GYMLUDRAFT_178103 [Gymnopus luxurians FD-317 M1]
```

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results (B)

Protein View: gi|615462389

catalase [Colletotrichum fioriniae PJ7]

Database:	NCBInr
Score:	317
Monoisotopic mass (M_r):	78222
Calculated pI:	5.71
Taxonomy:	Colletotrichum fioriniae PJ7

This protein sequence matches the following other entries:

- gi|588896546 from Colletotrichum fioriniae PJ7

Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|615462389 against nr.

Search parameters

MS data file:	LTQ_17K202_Labsupply.mgf
Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications:	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications:	Deamidated (NQ), Oxidation (M)

Protein sequence coverage: 8%

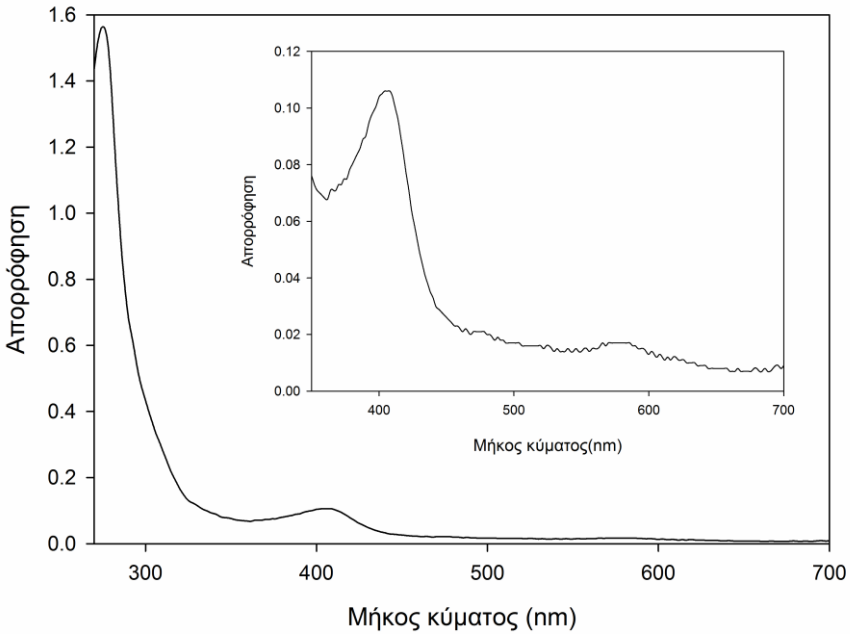
Matched peptides shown in ***bold red***.

```
  1 MHTTLLLAGL GLATLSSAGC PFADPSNIKA RTEDGSRGHV SGYEIDDSTG
 51 DPYLTSDVGG PIEDQVSLKA GVRGSTLLED FIFRQKITHF DHERVPERAV
101 HARGAGAYGT FTSYGDYSNL TAASFLGAAG KQTSTFVRFS TVAGSRGSAD
151 TARDVHGFAT RFFTDEGNFD IVGNNIPVFF IQDAIQFPDL IHAVKPRGDS
201 EIPQAATAHD SAWDFFSSQT TTLHTLFWAM AGYGIPRSYR HMDGFGVHTF
251 RAVTDDGKSK LIKWHWKTQQ GKASLVWEEA QIVSGKNADY HRQDLWDAIE
301 SGNGPEWELC VQVVDEEDTL KFGFDLLDPT KIIPEEIAPL QKLGKMKLDA
351 NPVNYFAETE QIMFQPGHIV RGIDFTEDPL LQGRIFSYLD TQINRHGGPN
401 FEQLPINRPI GPIHNNNRDG AGQNFIHRNR NSYTPNTLNK GFPKQANQTQ
451 GNGFFTAPGR TNNGHLVREI SDSFSDHWSQ PRLFYNSLTP IEQQFLINAI
501 RFETSHLEST EVKQNVLTQL NKVSNDIANR VADALGMEHL QPDAQYYHNK
551 TTQGLSIFGN KLPSIATLKV GVLASLSANG SVSQGKELKD AFAADGVLVT
601 VIAEKLTDGV DMTYAQADAT SFDGVIVARN ADGLFNGNIK PSPLYPAGRP
```

Εικόνα 6.2 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης των πρωτεομικών δεδομένων μέσω του λογισμικού Mascot για την C12O. (A) Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες με την μεγαλύτερη επικάλυψη πεπτιδίων, από τις οποίες έχουν υπογραμμιστεί οι καταχωρήσεις που υποδηλώνουν δράση καταλάσης. (B) Η αλληλουχία με την υψηλότερη επικάλυψη (κόκκινα γράμματα) με την απομονωμένη πρωτεΐνη.

Η ενεργότητα καταλάσης επιβεβαιώθηκε πραγματοποιώντας αντίδραση με 10 mM H_2O_2 και παρακολουθώντας έντονη απελευθέρωση οξυγόνου. Οι καταλάσες γενικά έχει φανεί ότι είναι διλειτουργικά ένζυμα. Οι περισσότερες εμφανίζουν επιπλέον δράση PPO, δηλαδή οξείδωση φαινολικών υποστρωμάτων χωρίς τη χρήση κάποιου συμπαράγοντα (Yuzugullu et al., 2013). Επίσης μία κατηγορία καταλασών εμφανίζει επιπλέον δράση υπεροξειδάσης, χρησιμοποιώντας H_2O_2 ως συμπαράγοντα για οξείδωση φαινολικών (Lončar and Fraaije, 2015)

Στη συνέχεια ελήφθη το φάσμα UV/Vis του ενζύμου με σκοπό την ταυτοποίηση του μετάλλου που φέρει στο ενεργό του κέντρο (Διάγραμμα 6.1). Το φάσμα, εκτός από τα 280 nm, εμφανίζει μέγιστα στα 407 nm και 580 nm, τα οποία είναι χαρακτηριστικά της αίμης *b* (Yuzugullu et al., 2013). Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, οι διοξυγενάσες της κατεχόλης φέρουν στο ενεργό τους κέντρο είτε Fe^{3+} (C12O) είτε Fe^{2+} (C23O) αλλά όχι αίμη (Bugg, 2011). Συγκεκριμένα οι C12O παρουσιάζουν τοπικό μέγιστο στο φάσμα τους στα 440 nm (Briganti et al., 1997; Micalella et al., 2011). Από την άλλη, όπως είναι γνωστό, οι καταλάσες πραγματοποιούν την κατάλυση χρησιμοποιώντας την αίμη που βρίσκεται στο ενεργό τους κέντρο.



Διάγραμμα 6.1 Φάσμα UV/Vis της απομονωμένης πρωτεΐνης στο οποίο φαίνεται με λεπτομέρεια η περιοχή από 350-700 nm.

Οι πρωτεΐνες που φέρουν αίμη σπάνια δείχνουν ενεργότητες διοξυγενάσης. Οι πιο γνωστές διοξυγενάσες αίμης είναι οι 2,3-διοξυγενάση της τρυπτοφάνης (TDO) και η 2,3-διοξυγενάση της ινδολεαμίνης (IDO) που ανήκουν στην ίδια οικογένεια ενζύμων αλλά έχουν ελαφρώς διαφορετική ειδίκευση στα υποστρώματα που οξειδώνουν. Μάλιστα οι IDO μπορούν και δρουν και σαν υπεροξειδάσες (Geng and Liu, 2014).

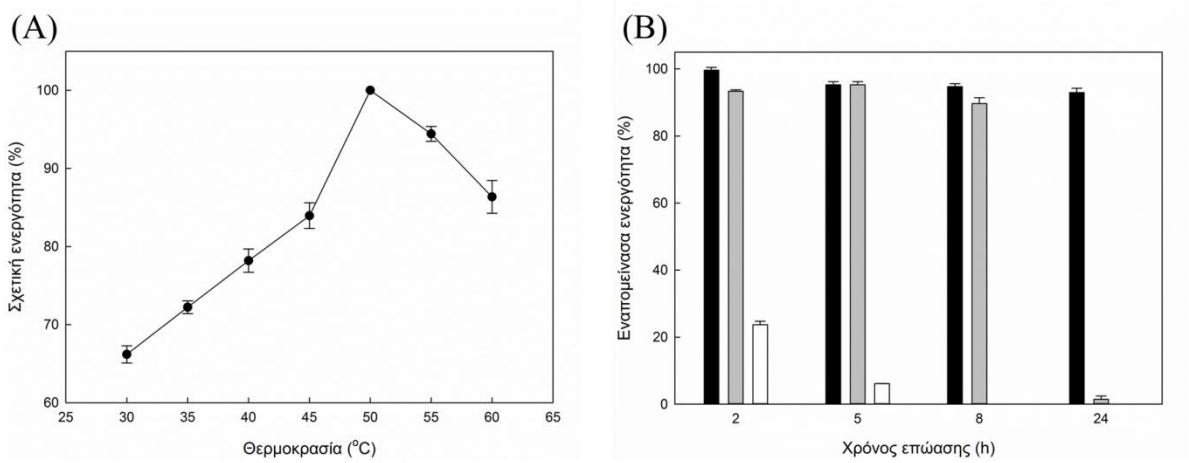
Η μόνη γνωστή καταλάση, ως τώρα, η οποία έχει και δράση TDO μόνο παρουσία $Na_2S_2O_4$, προέρχεται από το βακτήριο *Bacillus stearothermophilus* (Sagawa et al., 1999).

Η καταλάση που απομονώθηκε στη συγκεκριμένη εργασία είναι ακόμα πιο ιδιαίτερη περίπτωση, καθώς, παρότι φέρει αίμη στο ενεργό της κέντρο καταλύει αντίδραση C12O που σε φυσικά ένζυμα πραγματοποιείται με ιόντα σιδήρου και όχι αίμη. Στη συνέχεια το ένζυμο αυτό θα ονομάζεται CatC12O, λόγω της διπλής ενεργότητας που εμφανίζει.

6.2.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός της απομονωμένης CatC12O

6.2.1.1 Επίδραση θερμοκρασίας, αλάτων και παρεμποδιστών στη δράση της CatC12O

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της απομονωμένης CatC12O μελετήθηκε σε ένα εύρος θερμοκρασιών 30-60 °C μετρώντας ενεργότητα C12O με κατεχόλη ως υπόστρωμα. Η βέλτιστη θερμοκρασία παρατηρήθηκε στους 50 °C ενώ για θερμοκρασίες από 45-60 °C το ένζυμο διατήρησε ενεργότητα >85% της μέγιστης (Διάγραμμα 6.2A). Επιπρόσθετα, το ένζυμο έδειξε μεγάλη ανοχή στη θερμοκρασία καθώς παρέμενε σταθερό στους 50 °C για 24 h, ενώ είχε ελάχιστες απώλειες ύστερα από 8 h στους 60 °C (Διάγραμμα 6.2B). Αξιοσημείωτο ήταν ότι μπορούσε να διατηρήσει πάνω από το 20% της ενεργότητάς του ύστερα από επώαση 2 h στους 70 °C, καθώς είναι ένα ένζυμο που προέρχεται από μεσόφιλο μύκητα.

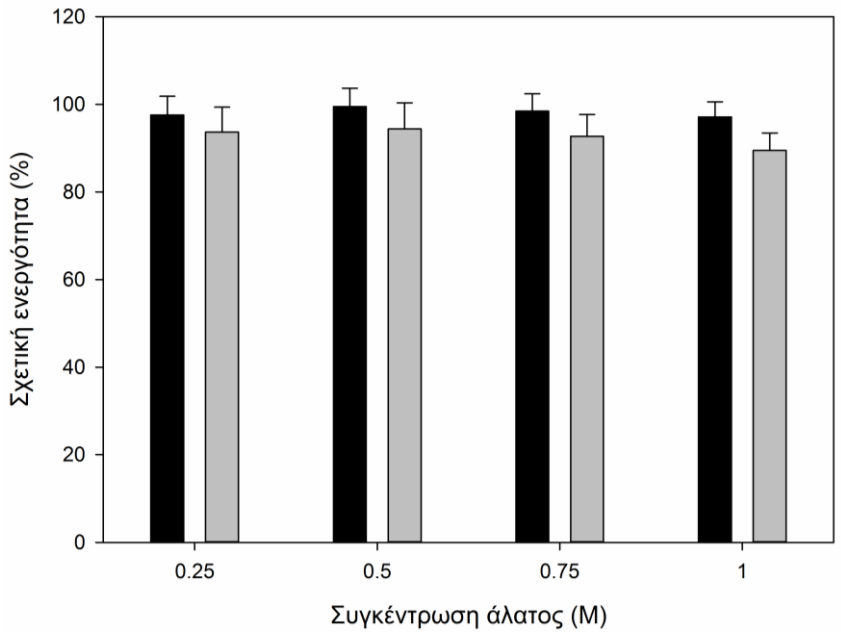


Διάγραμμα 6.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα (A) και στη σταθερότητα (B) της απομονωμένης CatC12O. Για τη μελέτη της σταθερότητας το ένζυμο επωάστηκε στους 50 °C (μαύρο), 60 °C (γκρι) και 70 °C (λευκό).

Γενικά οι καταλάσες είναι πολύ σταθερά ένζυμα, καθώς μπορούν και αντέχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 αλλά και θερμοκρασίες (Switala and Loewen, 2002). Από την άλλη, οι χαρακτηρισμένες C12O είναι αρκετά πιο ευαίσθητες στη θερμοκρασία. Η C12O της *Candida tropicalis* JH8 φαίνεται να είναι η πιο θερμοσταθερή διατηρώντας το 50% της ενεργότητάς της ύστερα από 4 h στους 50 °C (Long et al., 2016). Το αντίστοιχο ένζυμο του *Acinetobacter* sp. Y64 διατηρούσε μόνο το 20% της ενεργότητάς του ύστερα από 1 h επώαση στους 50 °C (Lin and Milase, 2015), ενώ η C12O του *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 έχανε το 50% της ενεργότητάς της ύστερα από 3 h στους 40 °C (Guzik et al., 2013a).

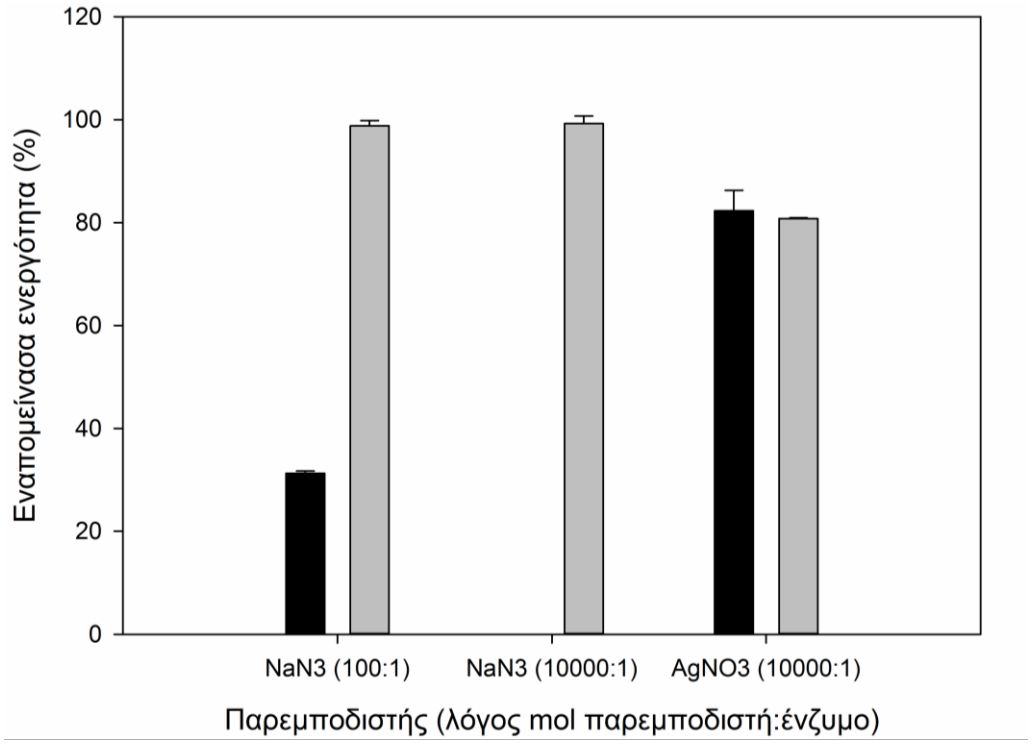
Εφόσον το ένζυμο προέρχεται από έναν μύκητα, ο οποίος είναι προσαρμοσμένος και ζει στη θάλασσα θελήσαμε να μελετήσουμε το πώς επηρεάζεται η ενεργότητά του από υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0-1 M των NaCl και $MgCl_2$ και μετρήθηκε η ενεργότητα C12O της CatC12O. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 6.3, οι συγκεντρώσεις αυτές επηρεάζουν ελάχιστα την ενεργότητα του ενζύμου (>90% εναπομείνασα ενεργότητα). Παρατηρείται όμως ότι το $MgCl_2$ έχει ελαφρώς πιο

αρνητική επίδραση στο ένζυμο από ότι το NaCl. Να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση αλάτων στη θάλασσα είναι περίπου 35 g/L που σε ισοδύναμα NaCl είναι 0.6 M.



Διάγραμμα 6.3 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αλάτων NaCl (μαύρο) και $MgCl_2$ (γκρι) στην ενεργότητα της απομονωμένης CatC12O. Οι σχετικές ενεργότητες υπολογίστηκαν με βάση την ενεργότητα χωρίς την προσθήκη άλατος.

Για να πάρουμε μία ένδειξη αν οι δύο διαφορετικές δράσεις (καταλάση και C12O) πραγματοποιούνται στο ίδιο ενεργό κέντρο, χρησιμοποιήσαμε έναν κλασικό παρεμποδιστή καταλάσης όπως το αζίδιο του νατρίου (NaN_3) και νιτρικό άργυρο ($AgNO_3$) που αποτελεί έναν κλασικό παρεμποδιστή C12O. Σε υψηλές συγκεντρώσεις αζιδίου, η ενεργότητα καταλάσης παρεμποδίζεται πλήρως, ενώ η ενεργότητα C12O παραμένει σταθερή (Διάγραμμα 6.4). Σε υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικού αργύρου και οι δύο ενεργότητες παρεμποδίζονται ελαφρώς (~20%).



Διάγραμμα 6.4 Εναπομείνασα ενεργότητα καταλάσης (μαύρο) και C12O (γκρι) ύστερα από επώαση με NaN_3 και $AgNO_3$ σε μοριακές αναλογίες (παρεμποδιστής προς ένζυμο) 100:1 και 10000:1.

Η καταλάση του *Thermobifida fusca*, η οποία εμφανίζει και ενεργότητα υπεροξειδάσης παρεμποδίστηκε από το NaN_3 με παρόμοιο τρόπο και για τις δύο ενεργότητες, αν και εντονότερα για την ενεργότητα καταλάσης (εναπομείνασα ενεργότητα καταλάσης 17% και υπεροξειδάσης 25%) (Lončar and Fraaije, 2015). Η C12O της *Candida albicans* TL3 παρεμποδίστηκε πάνω από 90% από $AgNO_3$ (Tsai and Li, 2007), ενώ οι C12O των *Rhodococcus erythropolis* AN-13 και *Geobacillus* sp. G27 παρεμποδίστηκαν πλήρως (Giedraityte and Kalėdienė, 2009; Subbotina et al., 2016).

6.2.1.2 Εξειδίκευση στα υποστρώματα της CatC12O

Η ειδική ενεργότητα της CatC12O υπολογίστηκε στο H_2O_2, στην κατεχόλη και σε άλλα κατεχολικά υποστρώματα. Όπως φαίνεται στον Πίνακα, το ένζυμο έχει 41 φορές υψηλότερη ειδική ενεργότητα στο H_2O_2 από ότι στην κατεχόλη.

Από την άλλη, η ενεργότητα στη υδροξυκινόλη (1,2,4-βενζοτριόλη) είναι 22 φορές μεγαλύτερη από ότι στην κατεχόλη. Άλλωστε, αυτή ήταν πιθανότατα η δράση που πραγματοποιούσε η CatC12O στο *Tritirachium* sp. ML197-S3 κατά την αποικοδόμιση της 2,4-DCP, σύμφωνα με τους ταυτοποιημένους μεταβολίτες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι το ενζυμο έχει ενεργότητα και σε χλωριωμένη κατεχόλη (4-χλωροκατεχόλη) αλλά όχι σε διχλωροκατεχόλη (3,5-διχλωροκατεχόλη).

Πίνακας 6.1 Ειδική ενεργότητα της CatC12O σε κατεχολικά υποστρώματα καθώς και στο υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Υπόστρωμα	**Ενεργότητα (U mg^{-1})**
Κατεχόλη	1.00 (0.00)
4-Χλωροκατεχόλη	0.38 (0.00)
Υδροξυκινόλη	22.33 (0.20)
3,5-Διχλωροκατεχόλη	-
2,3-Διϋδροξυ διφαινύλιο	-
H_2O_2	41.02 (2.73)

Για τις υπόλοιπες διλειτουργικές καταλάσες, ο λόγος ενεργότητας καταλάσης προς τη δεύτερη ενεργότητα είναι συνήθως πολύ υψηλότερος. Για παράδειγμα, για τις καταλάσες-υπεροξειδάσες η ενεργότητα καταλάσης κυμαίνεται από 3 μέχρι και πάνω από 10000 φορές υψηλότερα από την αντίστοιχη ενεργότητα υπεροξειδάσης. Πιο συγκεκριμένα για την καταλάση HPI του *E. coli* έχει 3 φορές υψηλότερη ενεργότητα καταλάσης (Hillar et al., 2000), οι καταλάσες του αρχαίου *Archaeoglobus fulgidus* και του βακτηρίου *Thermobifida fusca* μερικές εκατοντάδες φορές μεγαλύτερη (Kengen et al., 2001; Lončar and Fraaije, 2015), ενώ του *Mycobacterium tuberculosis* πάνω από 10000 φορές (Yu et al., 2009). Για κάποιες καταλάσες που δείχνουν ενεργότητα PPO, η καταλατική ενεργότητα κυμαίνεται από 73000 μέχρι 260000 φορές υψηλότερα από την ενεργότητα οξειδάσης.

Όσον αφορά την εξειδίκευση σε υποστρώματα των C12O, αυτή του *Acinetobacter* sp. Y64 έχει τη μισή ενεργότητα σε υδροξυκινόλη από ότι σε κατεχόλη (Lin and Milase, 2015), ενώ η C12O του *Acinetobacter radioresistens* εμφάνισε ενεργότητα στην 4-χλωροκατεχόλη μόλις το 6% αυτής σε κατεχόλη (στην περίπτωση της CatC12O το ποσοστό αυτό είναι 38%) (Briganti et al., 1997). Υπάρχει μία κατηγορία ενζύμων που ανήκουν στην οικογένεια των 1,2-διοξυγενασών τις κατεχόλης, οι οποίες είναι ειδικές για τις χλωροκατεχόλες. Για παράδειγμα δύο 1,2-διοξυγενάσες της χλωροκατεχόλης (CC12O) που απομονώθηκαν από την *Sphingomonas* sp. TFD44, έδειξαν μεγαλύτερη εξειδίκευση στην 3- χλωροκατεχόλη η μία και στην 3,5-διχλωροκατεχόλη η άλλη (Lang et al., 2005). Επίσης, μία CC12O από την *Pseudomonas chlororaphis* RW71, είχε ενεργότητα σε όλες τις διχλωροκατεχόλες, τριχλωροκατεχόλες αλλά και στην τετραχλωροκατεχόλη (Potrawfke et al., 2001). Από την άλλη, υπάρχουν τα αντίστοιχα ένζυμα που δείχνουν προτίμηση στην υδροξυκινόλη. Για παράδειγμα, η 1,2-διοξυγενάση της υδροξυκινόλης από την *Ralstonia pickettii* DTP0602 δεν μπορούσε να οξειδώσει την κατεχόλη και την 4-χλωροκατεχόλη, αλλά οξείδωνε την υδροξυκινόλη και την 6-χλωρο-υδροξυκινόλη (Hatta et al., 1999).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές του ενζύμου στην κατεχόλη και 4- χλωροκατεχόλη (Πίνακας 6.2). Παρότι η συγγένεια του ενζύμου για την κατεχόλη είναι υψηλότερη, η ταχύτητά του είναι σχεδόν διπλάσια στην 4-χλωροκατεχόλη.

Πίνακας 6.2 Κινητικές σταθερές της CatC12O σε δύο κατεχολικά υποστρώματα.

Υπόστρωμα	k_{cat} (min-1)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (min^{-1} mM^{-1})
Κατεχόλη	88.9 (3.8)	1.19 (0.05)	465.5 (70.1)
4-Χλωροκατεχόλη	146.0 (16.7)	4.78 (0.88)	30.5 (6.6)

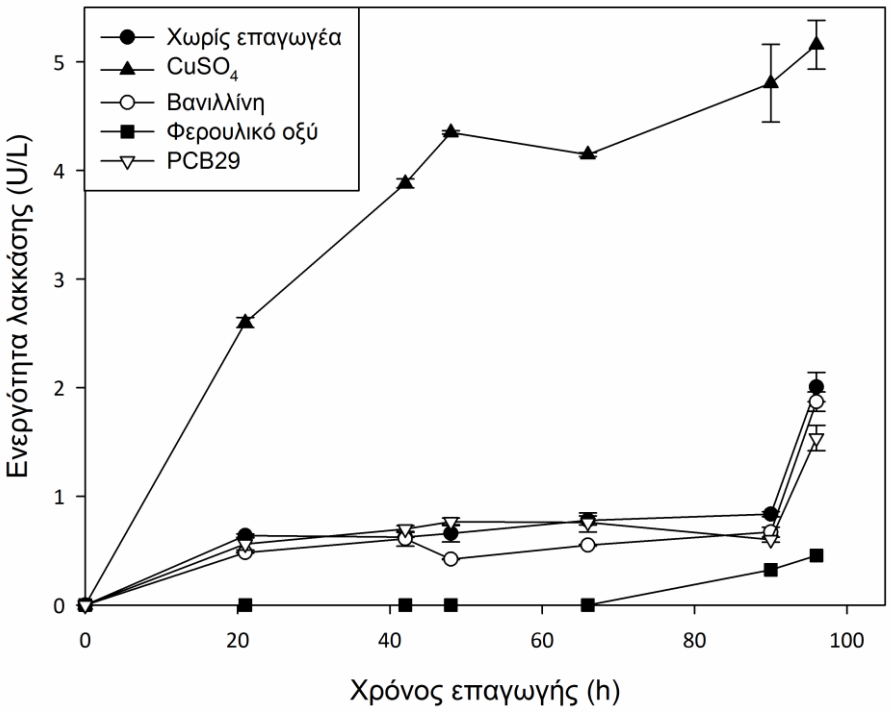
Στη βιβλιογραφία, οι K_M των C12O για την κατεχόλη κυμαίνονται από 2,04 μM για το ένζυμο του *Acinetobacter radioresistens* LMG S13 (Micalella et al., 2011) μέχρι 29 μM για τη C12O του *Geobacillus* sp. G27 (Giedraityte and

Kalėdienė, 2009), δηλαδή 2-3 τάξεις μεγέθους χαμηλότερα από ότι για την CatC12O. Οι καταλυτικές αποτελεσματικότητες (k_{cat}/K_M) των χαρακτηρισμένων C12O ήταν 4 τάξεις μεγέθους υψηλότερες από ότι της CatC12O, ενώ οι k_{cat} 6-19 φορές υψηλότερες. Γίνεται έτσι έκδηλο ότι η CatC12O δεν είναι πραγματική C12O. Όσον αφορά τις κινητικές σταθερές στην 4-χλωροφαινόλη, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες C12O, η CatC12O έχει παρόμοια k_{cat}/K_M με του *Acinetobacter radioresistens* LMG S13 (Micalella et al., 2011) και 3 τάξεις μεγέθους υψηλότερη από του *Rhodococcus opacus* 1CP (Subbotina et al., 2016). Οι περισσότερες χαρακτηρισμένες CC12O δείχνουν και πάλι υψηλότερες αποτελεσματικότητες στην κατεχόλη παρά στην 4-χλωροκατεχόλη (Lang et al., 2005; Matera et al., 2010), με εξαίρεση αυτή του *Pseudomonas chlororaphis* RW71(Potrawfke et al., 2001).

6.3 Απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός δύο λακκασών του μύκητα *Cladosporium* sp. TM138-S3

6.3.1 Μελέτη διαφορετικών επαγωγέων στην έκφραση λακκάσης

Ο μύκητας *Cladosporium* sp. TM138-S3 έδειξε την υψηλότερη έκφραση ενεργότητας λακκάσης κατά τη διαδικασία απομάκρυνσης του PCB29. Με σκοπό την αντικατάσταση του PCB29 ως επαγωγέα έκφρασης της ενεργότητας λακκάσης, δοκιμάστηκαν διαφορετικές ενώσεις, οι οποίες είναι γνωστό στη βιβλιογραφία ότι επάγουν τέτοιες ενεργότητες. Στο Διάγραμμα 6.5 παρουσιάζεται η πορεία της έκφρασης λακκάσης συναρτήσει του χρόνου για τους διαφορετικούς επαγωγείς. Παρατηρείται ότι σε ένα ποσοστό, η έκφραση λακκάσης πραγματοποιείται και χωρίς την προσθήκη κάποιου επαγωγέα. Μάλιστα σε όλες τις περιπτώσεις πλην των ιόντων χαλκού ($CuSO_4$), η έκφραση λακκάσης παρεμποδίζεται αντί να ενισχύεται. Το χειρότερο αποτέλεσμα έδωσε η προσθήκη του φερουλικού οξέος που οδήγησε σε μείωση κατά 80% της βασικής έκφρασης.



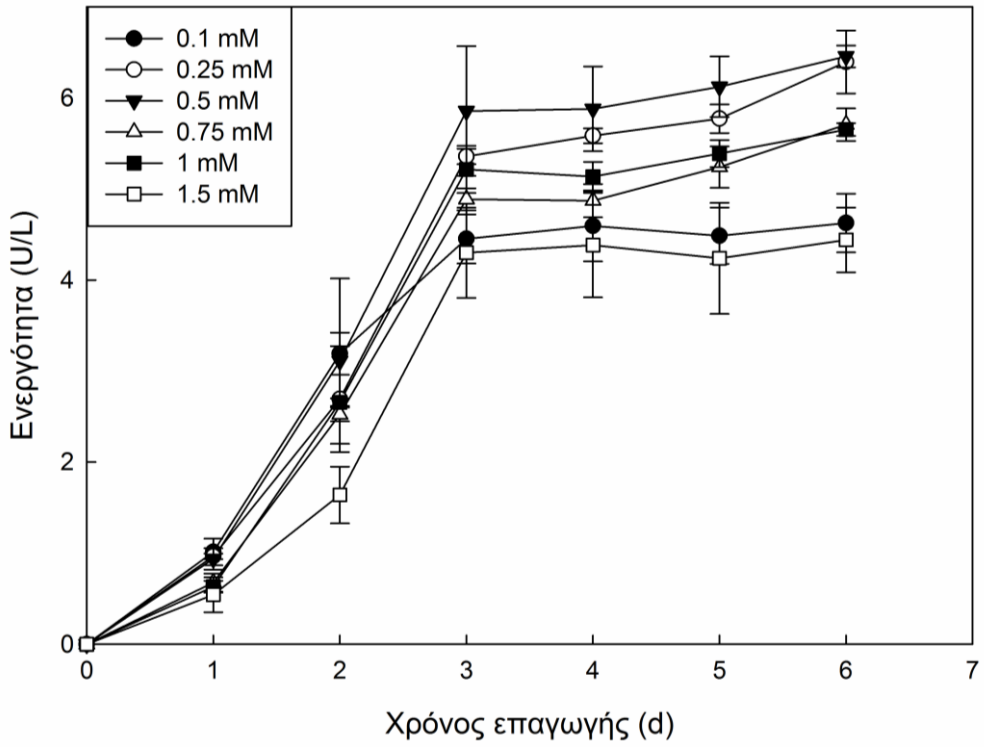
Διάγραμμα 6.5 Επίδραση διαφορετικών ουσιών στην επαγωγή ενεργότητας λακκάσης από τον *Cladosporium* sp. TM138-S3.

Η προσθήκη διαφορετικών ουσιών στις υγρές καλλιέργειες των μικροοργανισμών για τη μελέτη της επαγωγής της ενζυμικής έκφρασης αποτελεί διαδεδομένη ερευνητική μέθοδο (Cavallazzi et al., 2005; Passarini et al., 2015). Ο χαλκός αποτέλεσε το μοναδικό αποτελεσματικό επαγωγέα της έκφρασης λακκάσης αυξάνοντας την ενεργότητα 2,5 φορές, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς είναι ο πιο διαδεδομένος επαγωγέας της έκφρασης μυκητιακών λακκασών (Gomaa and Momtaz, 2015; Theerachat et al., 2018). Μάλιστα η προσθήκη χαλκού έχει βρεθεί να αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης λακκάσης 13 και 20 φορές στις καλλιέργειες των θαλάσσιων μυκήτων *Pestalotiopsis* sp. J63 (H.-Y. Chen et al., 2011) και *Polyporus brumalis* ibrc05015 αντίστοιχα (Theerachat et al., 2018). Το φερουλικό οξύ, παρότι στην προκειμένη περίπτωση παρουσίασε έντονη παρεμποδιστική δράση μειώνοντας την ενεργότητα, έχει παρατηρηθεί πως δρα ως επαγωγέας λακκάσης όταν προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας μυκήτων (Bertrand et al., 2013; Nakade et al., 2012; Subramanian et al., 2014). Για παράδειγμα, η προσθήκη φερουλικού οξέος στις υγρές καλλιέργειες των *Pholiota mutabilis* και *Pycnoporus cinnabarinus* είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της παραγωγής λακκάσης 3,4 και 2,8 φορές αντίστοιχα (Gianfreda et al., 1999). Η βανιλλίνη αναφέρεται στη βιβλιογραφία πως αποτελεί μεσολαβητή (Rivera-Hoyos et al., 2013) και υπόστρωμα λακκάσης (Zeng et al., 2017), αλλά υπάρχουν και περιορισμένες αναφορές επαγωγικής δράσης όταν προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας (Cavallazzi et al., 2005). Η προσθήκη του PCB29 δεν αύξησε το επίπεδο έκφρασης στις καλλιέργειες, αν και έχουν υπάρξει αναφορές αύξησης της ενεργότητας λακκάσης έως και 20 φορές σε καλλιέργειες του μύκητα *Pleurotus ostreatus* μετά την προσθήκη PCB (Gayosso-Canales et al., 2012).

6.3.2 Επίδραση συγκέντρωσης χαλκού στην έκφραση λακκάσης

Αφότου διαπιστώθηκε πως ο χαλκός αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό επαγωγέα έκφρασης λακκάσης στις κυτταρικές καλλιέργειες έγινε μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων χαλκού στην έκφραση και προσπάθεια προσδιορισμού της βέλτιστης συγκέντρωσης στο μέσο καλλιέργειας.

Μελετήθηκαν συγκεντρώσεις 0,1-1,5 mM που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 6.6.



Διάγραμμα 6.6 Επίδραση συγκέντρωσης χαλκού στην ενεργότητα λακκάσης που εκφράζει ο *Cladosporium* sp. TM138-S3.

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως η συγκέντρωση χαλκού στο εύρος που μελετήθηκε έχει μικρή επίδραση στην έκφραση λακκάσης. Ενδεικτικά θεωρώντας ως 100% τη μέγιστη ενεργότητα που καταγράφηκε, παρατηρούμε πως η ενεργότητα δεν πέφτει κάτω από το 68% σε καμία συγκέντρωση χαλκού. Οι συγκεντρώσεις που επιτυγχάνουν τη μέγιστη παραγωγή λακκάσης είναι 0,25 και 0,5 mM με αμελητέες διαφορές μεταξύ τους. Η μικρότερη ενεργότητα λακκάσης παρατηρήθηκε στη μικρότερη και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση χαλκού, 0,1 και 1,5 mM, αντίστοιχα.

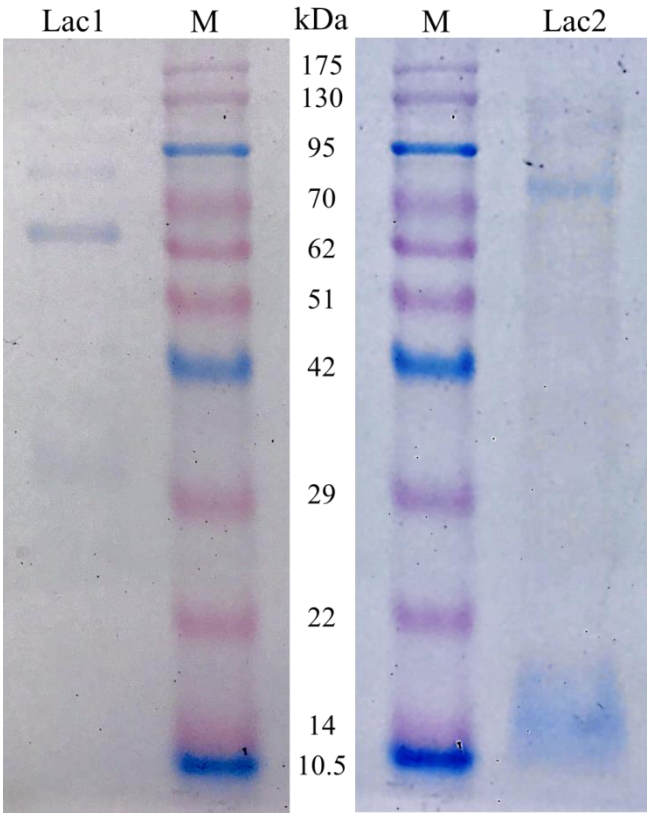
Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις χαλκού που βρέθηκαν αποτελούν συνηθισμένες τιμές για μυκητιακές καλλιέργειες (H.-Y. Chen et al., 2011). Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως η μικρότερη ενεργότητα λακκάσης παρατηρείται στη μικρότερη

και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση χαλκού. Ο χαλκός δρα ως επαγωγέας της παραγωγής λακκάσης όμως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι τοξικός για τους περισσότερους μικροοργανισμούς, καθώς τα ιόντα χαλκού αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, ένζυμα, νουκλεϊνικά οξέα και μεταβολίτες που σχετίζονται με σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες (Passarini et al., 2015; Subramanian et al., 2014). Ενδεικτικά η παρουσία χαλκού σε συγκεντρώσεις μέχρι 0,5 mM αύξησε 13 φορές την παραγωγή λακκάσης από το θαλάσσιο μύκητα *Pestalotioptis* sp., ενώ παρατηρήθηκε έντονη μείωση της παραγωγής λακκάσης για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (H.-Y. Chen et al., 2011). Η χαμηλή ενεργότητα που παρατηρήθηκε για τη συγκέντρωση 0,1 mM μπορεί να αποδοθεί στη μικρή ποσότητα χαλκού στο θρεπτικό μέσο με αποτέλεσμα τα ιόντα Cu^{2+} να μην επαρκούν για όλα τα ενεργά κέντρα των πρωτεϊνικών μορίων ώστε να μην υποστηρίζεται η μετα-μεταφραστική τροποποίηση του ενζύμου (Jaber et al., 2017; Theerachat et al., 2018). Επιπλέον, σε καλλιέργειες φυτικών κυττάρων που περιείχαν χαλκό συγκέντρωσης μικρότερης από 100 μg/L, παρατηρήθηκε η παραγωγή ανενεργών λακκασών χωρίς χαλκό ή η παραγωγή ενεργών λακκασών μέχρι να τελειώσουν τα αποθέματα χαλκού στην καλλιέργεια (Gianfreda et al., 1999).

6.3.3 Απομόνωση λακκασών με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής

Το εξωκυτταρικό υγρό που προέκυψε από την έκφραση σε βιοαντιδραστήρα 12 L φιλτραρίστηκε, συμπυκνώθηκε και εξισορροπήθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα της στήλης ιοντοεναλλαγής Q-sepharose (pH 5,5). Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl. Με αυτόν τον τρόπο ελήφθησαν δύο κλάσματα με ενεργότητα λακκάσης. Για να απομονωθούν περαιτέρω τα δύο ισοένζυμα λακκάσης, το πρώτο (Lac1) διήλθε μέσω στήλης Q-sepharose εξισορροπημένης σε Bis-Tris pH 6.5, ενώ το δεύτερο (Lac2) μέσω στήλης DEAE-cellulose εξισορροπημένης σε πιπεραζίνη pH 5,5. Η καθαρότητα των κλασμάτων καθώς και το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-PAGE (Εικόνα 6.3) στα περίπου 65 kDa για την Lac1 και 75 kDa για

την Lac2. Στην πηκτή επίσης παρατηρείται ότι η Lac2 είναι ιδιαίτερα ασταθής και πιθανότατα προτεολύεται κατά την αποθήκευση.



Εικόνα 6.3 Ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE των απομονωμένων πρωτεϊνών. Στο πήκτωμα φαίνονται η Lac1 και η Lac, ενώ ανάμεσά τους είναι οι πρότυπες πρωτεΐνες (M) .

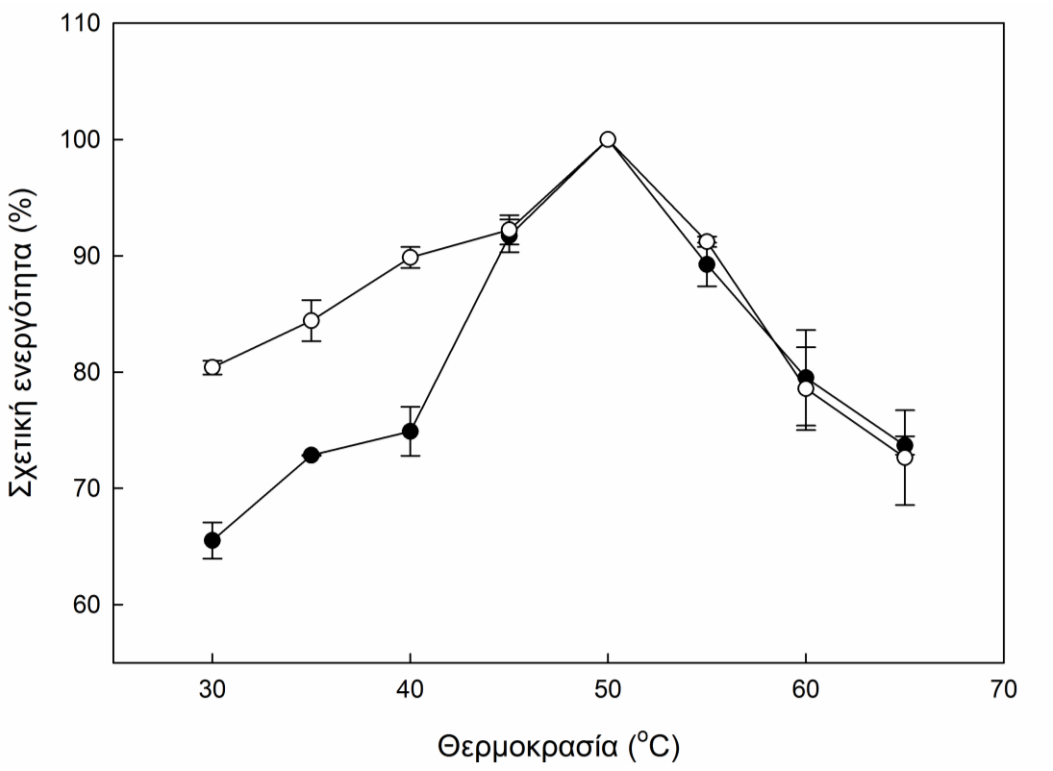
Οι λακκάσες, όπως και τα περισσότερα λιγνινολυτικά ένζυμα, είναι ως επί το πλείστον εξωκυτταρικά ένζυμα (Baldrian, 2006; Otto and Schlosser, 2015) και συνεπώς απομονώνονται από το εξωκυτταρικό υγρό των καλλιεργειών (Chmelova and Ondrejovic, 2016; Gaviria-Arroyave et al., 2018; Rezaei et al., 2017), όπως και στην παρούσα εργασία. Από το *Cladosporium* sp. απομονώθηκαν δύο λακκάσες. Είναι σύνηθες να παράγονται πολλαπλά ισοένζυμα από ένα μυκητιακό στέλεχος (Morozova et al., 2007; Subramanian et al., 2014; Zhuo et al., 2018). Ενδεικτικά στο στέλεχος *Marasmius quercophilus* S17 έχει αναφερθεί η ύπαρξη 7 ισοενζύμων λακκάσης (Nunes and Kunamneni, 2018).

Στη βιβλιογραφία, οι έρευνες απομόνωσης λακκάσης από διάφορους μικροοργανισμούς πραγματοποιούνται σε πολλαπλά στάδια (Chakroun et al.,

2010; Kiiskinen et al., 2004; Si et al., 2013), αν και υπάρχουν περιορισμένες αναφορές για την απομόνωση λακκάσης σε ένα στάδιο με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας (Do Rosario Freixo et al., 2014; Rezaei et al., 2017). Στη συγκεκριμένη διατριβή οι δύο λακκάσες απομονώθηκαν σε 2 στάδια με μεθόδους χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής με τελική ποσοστιαία ανάκτηση ενεργότητας 17% για τη Lac1 και 23% για τη Lac2. Τα μοριακά βάρη των λακκασών που απομονώθηκαν σε αυτήν την εργασία είναι κοντά στο εύρος τιμών 60-70 kDa που παρουσιάζουν οι περισσότερες μυκητιακές λακκάσες αν και υπάρχουν αναφορές λακκασών με μικρότερα (43 kDa) (Baldrian, 2006) αλλά και υψηλότερα (140 kDa) (Rivera-Hoyos et al., 2013) μοριακά βάρη. Επίσης άλλη λακκάση που έχει απομονωθεί από ένα στέλεχος *Cladosporium cladosporioides* είχε μοριακό βάρος 75 kDa (M. Halaburgi et al., 2011) σε συμφωνία με τη Lac2.

6.3.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός

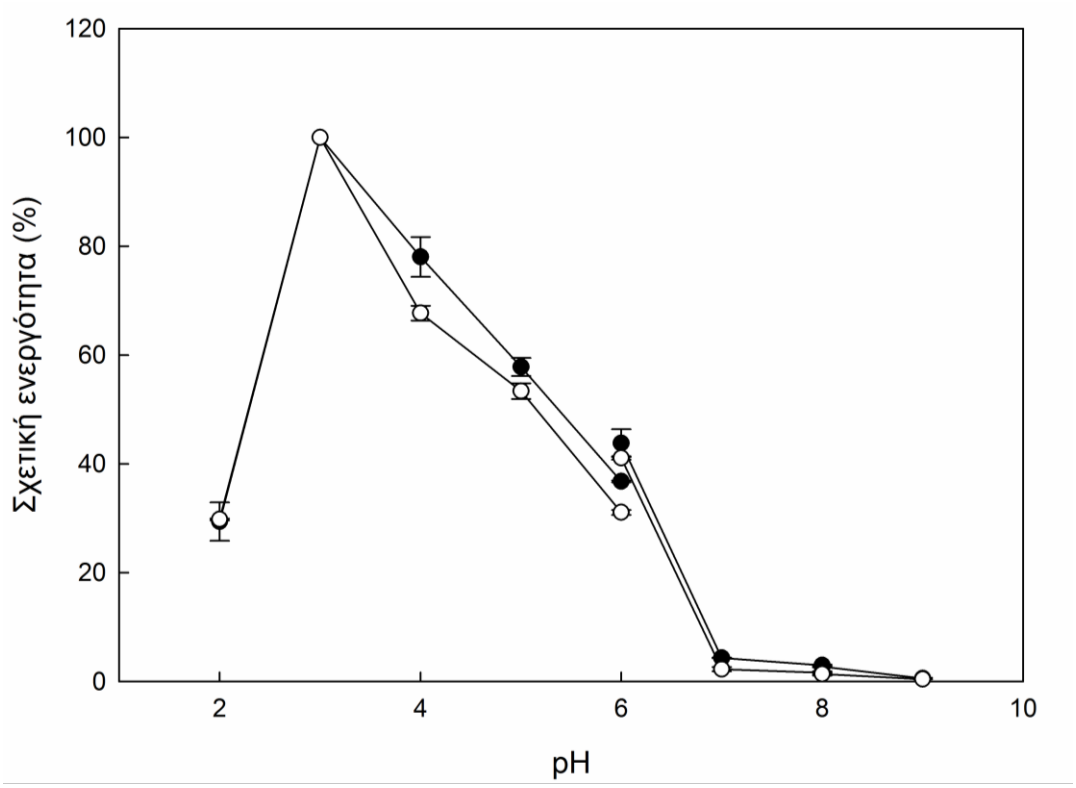
Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα των απομονωμένων λακκασών μελετήθηκε σε μία περιοχή θερμοκρασιών 30-65 °C. Η βέλτιστη θερμοκρασία παρατηρήθηκε στους 50 °C και για τα δύο ένζυμα, ενώ η Lac2 φαίνεται να διατηρεί υψηλότερη δραστικότητα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Διάγραμμα 6.7). Συνολικά όμως και τα δύο ένζυμα διατήρησαν πάνω από το 65% της μέγιστης ενεργότητάς τους σε όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες.



Διάγραμμα 6.7 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα των λακκασών Lac1 (●) και Lac2 (○).

Γενικά το προφίλ θερμοκρασίας-ενεργότητας λακκάσης δε διαφέρει από των υπόλοιπων εξωκυτταρικών λιγνινολυτικών ενζύμων παρουσιάζοντας βέλτιστο στο εύρος 50-70 °C (Baldrian, 2006). Ενδεικτικά, οι λακκάσες που έχουν απομονωθεί από τους Βασιδιομύκητες *Pleurotus pulmonarius* και *Pleurotus florida* παρουσιάζουν βέλτιστο στους 50 °C (Afreen et al., 2017), όπως επίσης και η λακκάση του μύκητα λευκής σήψης *Trametes versicolor* (Desai and Nityanand, 2011).

Όσον αφορά το pH, και τα δύο ένζυμα μέγιστη ενεργότητα σε pH 3 και σχεδόν το ίδιο προφίλ για τη μελετώμενη περιοχή pH 2-9. Και στις δύο λακκάσες, η ενεργότητα πέφτει στο 30% για pH 2, ενώ διατηρείται πάνω από το 50% στο εύρος pH 3-5, αλλά για τιμές pH άνω του 6 μειώνεται σημαντικά (Διάγραμμα 6.8).



Διάγραμμα 6.8 Επίδραση του pH της αντίδρασης στην ενεργότητα των λακκασών Lac1 (●) και Lac2 (○) για ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικών φωσφορικών (pH 2-6), φωσφορικών (pH 6-7) και Tris-HCl (pH 8-9).

Βιβλιογραφικά, η τιμή pH 3 είναι η βέλτιστη για τις περισσότερες μυκητιακές λακκάσες που έχουν εξεταστεί με τη χρήση του υποστρώματος ABTS (Baldrian, 2006), όπως το θαλάσσιο στέλεχος *Cerrena unicolor* MTCC 5159 (Theerachat et al., 2018). Γενικά οι βέλτιστες ενεργότητες παρατηρούνται σε όξινες τιμές pH μέχρι 5,6 (Nunes and Kunamneni, 2018). Η ενεργότητα και των δύο λακκασών Lac1 και Lac2 εμφανίζει σημαντική μείωση για τιμές pH μεγαλύτερες του 6. Συγκεκριμένα για ουδέτερο pH, η Lac1 και η Lac2 παρουσιάζουν ενεργότητα 4% και 2% αντίστοιχα, ενώ για βασικές τιμές pH δεν εμφανίζουν καθόλου ενεργότητα. Παρόμοιο προφίλ pH-ενεργότητας παρουσιάζει και η λακκάση που έχει απομονωθεί από το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis* CFTRI (Afreen et al., 2017). Η έλλειψη ενεργότητας για βασικές τιμές pH αποδίδεται στη δέσμευση ενός ανιόντος υδροξειδίου στο τριπυρηνικό σύμπλεγμα, το οποίο εμποδίζει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το χαλκό T1 στο σύμπλεγμα παρεμποδίζοντας την

καταλυτική δράση της λακκάσης (Khlifi et al., 2010; Kunamneni et al., 2008; Zeng et al., 2017).

6.3.5 Μελέτη εξειδίκευσης των Lac1 και Lac2 ως προς το υπόστρωμα

Μερικές φαινολικές ενώσεις, οι οποίες είχαν διαφορετικές υποκαταστάσεις στον φαινολικό δακτύλιο, χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να δοκιμαστεί η εξειδίκευση των ενζύμων σε υποστρώματα. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.3 δείχνουν την ικανότητα κάθε ενζύμου να οξειδώνει το κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά.

Πίνακας 6.3 Εξειδίκευση των λακκασών Lac1 και Lac2 για την οξείδωση διαφορετικών υποστρωμάτων.

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

Η Lac1 παρουσίασε δυνατότητα οξείδωσης μεγαλύτερου εύρους υποστρωμάτων σε σύγκριση με τη Lac2, όμως καμία από τις δύο λακκάσες δεν μπόρεσαν να οξειδώσουν την L-DOPA. Η Lac2 δεν μπόρεσε επίσης να οξειδώσει την υδροκινόνη και το καφεϊκό οξύ.

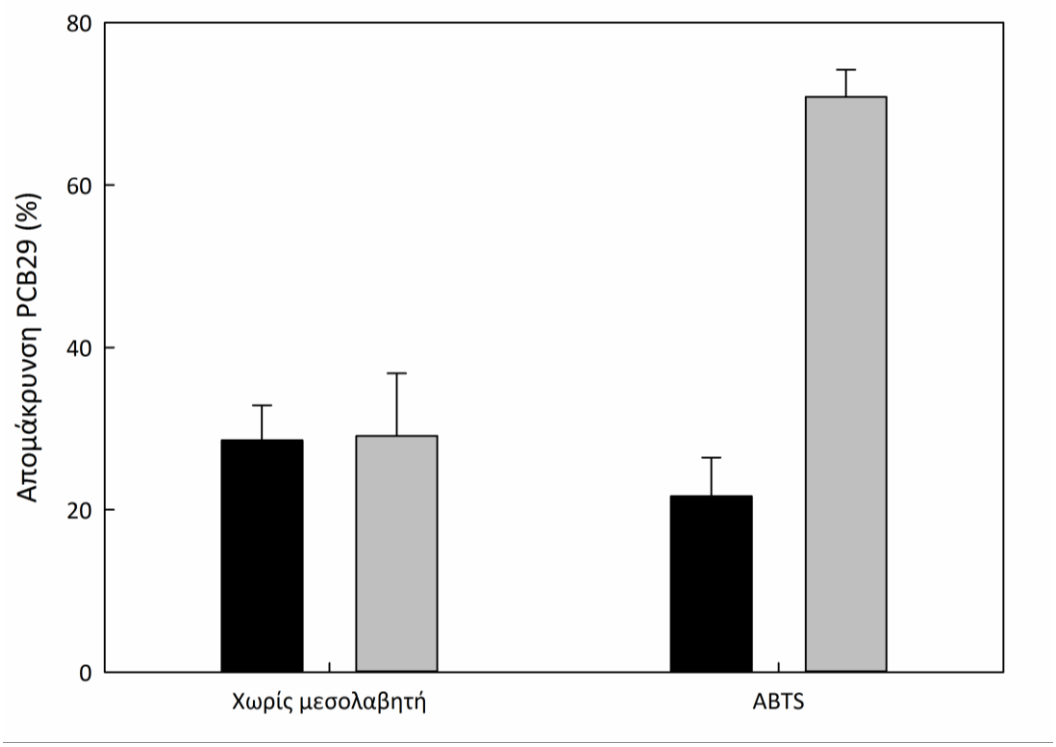
Οι δύο λακκάσες παρουσιάζουν διαφορές ως προς την καταλυτική τους δράση, κάτι το οποίο είναι γενικό γνώρισμα αυτής της ομάδας ενζύμων και έχει παρατηρηθεί και στα ισοένζυμα λακκάσης του μύκητα *T. versicolor* (Svobodová and Cajthaml, 2012). Παρότι η L-DOPA δεν οξειδώθηκε από καμία από τις δύο λακκάσες, υπάρχουν αναφορές πως οξειδώνεται από λακκάσες αλλά και

τυροσινάσες (Tisma et al., 2008). Η Lac1 παρουσίασε τη μέγιστη ενεργότητα στην πυρογαλλόλη ενώ η Lac2 στο γαλλικό οξύ, ενώσεις που είναι όρθο-υποκατεστημένες και περιέχουν 3 υδροξύλια στο φαινολικό τους δακτύλιο αποτελώντας συνηθισμένα υποστρώματα λακκασών (Afreen et al., 2017; Baldrian, 2006; Dwivedi et al., 2011; Kiiskinen et al., 2004), ενώ οξείδωσαν και τη γουαϊακόλη. Η γουαϊακόλη αναφέρεται βιβλιογραφικά πως οξειδώνεται από τις λακκάσες και μάλιστα με γρήγορους ρυθμούς αντίδρασης (Bonugli-santos et al., 2010). Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί πως σε *παρα*-υποκατεστημένες ενώσεις όπως η υδροκινόνη παρουσιάζονται μικρότεροι ρυθμοί οξείδωσης (Blaich and Esser, 1975). Αντίστοιχα αργοί ρυθμοί οξείδωσης έχουν αναφερθεί και για το καφεϊκό οξύ αν και ανήκει στις *ορθο*-υποκατεστημένες φαινολικές ενώσεις (Senthivelan et al., 2016) και έχει αναφερθεί πως δρα και ως μεσολαβητής για τις λακκάσες (Nunes and Kunamneni, 2018). Τέλος, τα δύο ένζυμα παρουσίασαν χαμηλή ενεργότητα στην κατεχόλη. Παρόμοια αποτελέσματα από απομονωμένες μυκητιακές λακκάσες έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες ερευνητικές εργασίες στη διεθνή βιβλιογραφία (Atalla et al., 2013; D. Zhao et al., 2012).

6.3.6 Απομάκρυνση του PCB29 με τις απομονωμένες λακκάσες

Για να ελεγχθεί εάν αυτά τα ένζυμα είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση του PCB29 από το *Cladosporium sp.* TM138-S3, ελέγχθηκαν σε αντιδράσεις που περιείχαν 1 μM PCB29 σε pH5. Οι αντιδράσεις απουσία ή παρουσία ABTS συγκέντρωσης 0,5 μM ως μεσολαβητή, πραγματοποιήθηκαν για 20 ώρες στους 35 °C. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 6.9 δείχνουν ότι και τα δύο ένζυμα έχουν πολύ χαμηλή ικανότητα απομάκρυνσης του ρύπου απουσία μεσολαβητή (~30%). Παρουσία ABTS, η Lac2 ήταν ικανή να απομακρύνει το 71% του PCB29.

Η ικανότητα βιοαποικοδόμησης των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων από μύκητες έχει επανειλημμένα συνδεθεί με τα εξωκυτταρικά οξειδωτικά τους ένζυμα, όπως οι λακκάσες (Takagi et al., 2007).



Διάγραμμα 6.9 Ποσοστιαία μείωση συγκέντρωσης του PCB29 μετά το πέρας 20 ωρών παρουσία μεσολαβητή ABTS, είτε απουσία για τις λακκάσες Lac1 (μαύρο) και Lac2 (γκρι).

Ενδεικτικά από τη βιβλιογραφία, η μείωση των επιπέδων του PCB από το βασιδιομύκητα *Pleurotus ostreatus* έχει συνδεθεί με την ενεργότητα λακκάσης του μικροοργανισμού (Gayosso-Canales et al., 2012). Η αποικοδόμηση του PCB από τις λακκάσες έχει εξεταστεί με προσθήκη του PCB στο μέσο καλλιέργειας των μικροοργανισμών (Gayosso-Canales et al., 2012; Novotny et al., 2004) αλλά και με αντιδράσεις των απομονωμένων ενζύμων με το ρύπο (Barrios-Estrada et al., 2018; Nakagawa et al., 2010). Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός της ενζυμικής αποικοδόμησης των PCBs δεν έχει διαλευκανθεί ακόμα (Borja et al., 2005). Η παρουσία του ABTS έχει αναφερθεί πως ενισχύει την αποικοδόμηση των υδροξυλιωμένων παράγωγων του PCB (OH-PCBs) από απομονωμένες λακκάσες των μυκήτων *Trametes versicolor* και *Pleurotus ostreatus* (Barrios-Estrada et al., 2018; Keum and Li, 2004). Επίσης, η παρουσία μεσολαβητών επιτρέπει την οξείδωση των έντονα χλωριωμένων διφαινυλίων από τις λακκάσες (Marco-Urrea and Reddy, 2012).

7 Ανακάλυψη, χαρακτηρισμός και πρωτεϊνική μηχανική μιας πολυφαινολοξειδάσης του μύκητα *T. thermophila*

Οι πολυφαινολοξειδάσες (PPOs) έχουν συνδεθεί κυρίως με το ανεπιθύμητο μαύρισμα σε φρούτα και λαχανικά μετά τη συγκομιδή τους, καθώς και με επιπτώσεις στην ανθρώπινη μελανογένεση. Παρόλα αυτά, θεωρούνται χρήσιμοι βιοκαταλύτες στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων (Faccio et al., 2012; Isaschar-Ovdat and Fishman, 2018). Σκοπός μας ήταν η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός μιας νέας PPO και η διερεύνηση της δυνατότητάς της ως προς τη βιοαποικοδόμιση χλωριωμένων ρύπων.

Οι μηχανιστικές και δομικές μελέτες των τυροσινασών είναι σημαντικές για την ανάπτυξη πιθανών αναστολέων για χρήση σε ασθένειες που σχετίζονται με υπερχρωματισμό σε ανθρώπους (Buitrago et al., 2016). Εκτός αυτού όμως, οι PPOs έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοαισθητήρες για την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων φαινολικών σε μολυσμένα νερά (Gul et al., 2017). Επιπρόσθετα, έχουν παρουσιάσει δυνατότητες για τη βιοεξυγίανση λυμάτων που περιέχουν φαινολικά και για τη μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) σε αυτά (Edalli et al., 2016; Faccio et al., 2012; Mukherjee et al., 2013). Όπως αναφέρθηκε πρόσφατα (Ba and Vinoth Kumar, 2017), παρόλο που οι λακκάσες έχουν μελετηθεί εκτενώς, η οικογένεια των PPO παραμένει ελάχιστα μελετημένη ειδικά όσον αφορά την εφαρμογή της για την απομάκρυνση φαινολικών.

7.1 Ανακάλυψη, κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου της *Tt*PPO

Αρκετές PPO έχουν εκφραστεί ετερόλογα σε διαφορετικούς ξενιστές. Για παράδειγμα, η ανθρώπινη τυροσινάση έχει εκφραστεί σε δύο διαφορετικά είδη κυττάρων εντόμων, καθώς και σε *E. coli* (G.-H. Chen et al., 2012; Lai et al., 2016). Το γονίδιο της τυροσινάσης από το στρείδι μαργαριταριού *Pinctada fucata* εκφράστηκε *in vitro* με τη χρήση του συστήματος μεταγραφής του *E. coli*, χωρίς τη χρήση κυττάρων (Takgi et al., 2014). Φυτικές PPOs από το λουλούδι *Coreopsis grandiflora* (Kaintz et al., 2014) και το σταφύλι *Vitis vinifera* (Solem et al., 2016) εκφράστηκαν λειτουργικά σε *E. coli*, ενώ οι PPOs από το τεϊόδεντρο *Camellia*

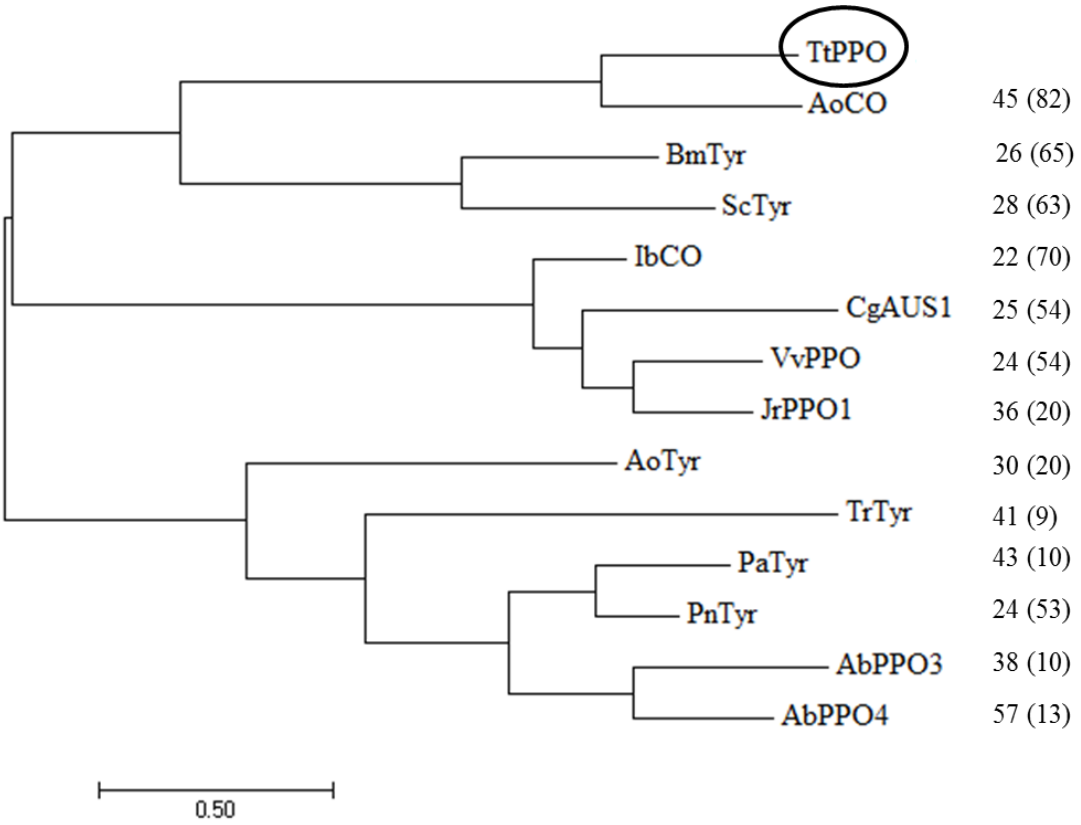
sinensis δεν μπόρεσαν να εκφραστούν ούτε σε προκαρυωτικούς ούτε σε ευκαρυωτικούς ξενιστές (Y.-L. Wu et al., 2010). Όσον αφορά τις PPO από μανιτάρια, έχουν εκφραστεί αρκετές του *Agaricus bisporus* σε *E. coli* (Pretzler et al., 2017; J. Wu et al., 2010) και *Saccharomyces cerevisiae* (Lezzi et al., 2012), ενώ και η τυροσινάση του *Polyporus arcularius* έχει εκφραστεί σε κύτταρα *E. coli* (Marková et al., 2016). Βακτηριακές τυροσινάσες από διάφορα γένη (*Verrucomicrobium*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Ralstonia* and *Marinomonas*) έχουν εκφραστεί και αυτές ετερόλογα και χαρακτηριστεί (Cabrera-Valladares et al., 2006; Hernandez-Romero et al., 2006; López-Serrano et al., 2002; Ren et al., 2013; Shuster and Fishman, 2009). Τέλος, ελάχιστες PPO από ασκομύκητες έχουν εκφραστεί σε ετερόλογους ξενιστές: κάποιες του *Aspergillus oryzae* εκφράστηκαν σε *Trichoderma reesei* (Hakulinen et al., 2013), *Yarrowia lipolytica* (Rao et al., 2011) και *E. coli* (Fujieda et al., 2012) και η τυροσινάση του *Trichoderma reesei* εκφράστηκε σε *Pichia pastoris* (Westerholm-Parvinen et al., 2007).

Σύμφωνα με το JGI Genome Portal, η *T. thermophila* περιέχει 9 γονίδια που εκφράζουν ένζυμα της οικογένειας των τυροσινασών, 6 από τα οποία είναι εξωκυτταρικά. Μεταγραφική ανάλυση έχει δείξει ότι από αυτά τα 6 γονίδια, αυτό το οποίο εκφράζει την πρωτεΐνη με κωδικό 60685 μεταγράφεται σε υψηλότερα επίπεδα από τα υπόλοιπα, όταν ο μύκητας μεγαλώνει σε γλυκόζη, ενώ η αντίστοιχη πρωτεΐνη είναι η μόνη που έχει εντοπιστεί στο εξωκυτταρικό με MS (Berka et al., 2011). Έχει επίσης φανεί ότι τα ένζυμα της οικογένειας των τυροσινασών επάγονται από λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα όπως το άχυρο αλφάλφα. Η υποθετική πρωτεΐνη επιλέχθηκε σαν υποψήφια τυροσινάση και το αντίστοιχο γονίδιο (*Tt60685*) κλωνοποιήθηκε στην *P. pastoris* X-33.

7.1.1 Κλωνοποίηση και ανάλυση αλληλουχίας της υποθετικής PPO

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του γονιδίου *Tt60685* της *T. thermophila* (GenBank accession no. NC_016477.1) εμπεριέχει ένα εσώνιο 219 bp (base pairs) και κωδικοποιεί ένα υποθετικό ένζυμο της οικογένειας των τυροσινασών 424 αμινοξέων συμπεριλαμβανομένου και ενός πεπτιδίου σήματος 22 αμινοξέων (MKPAALLGAALAAVAFPAGAHA). Η ευθυγράμμιση αυτής της

πρωτεϊνικής αλληλουχίας (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) με αυτές της PDB, αποκάλυψε την υψηλότερη ομοιότητα (45%) με την κατεχολοξειδάση του *A. oryzae* (Hakulinen et al., 2013), ακολουθούμενη από βακτηριακές τυροσινάσες των *Streptomyces castaneoglobisporus* (Matoba et al., 2006) και *Bacillus megaterium* (Sendovski et al., 2011), με ομοιότητες 28% και 26% αντίστοιχα. Ένα φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε μετά την ευθυγράμμιση αυτών των πρωτεϊνικών αλληλουχιών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μέγιστης πιθανότητας (Maximum Likelihood method) (Διάγραμμα 7.1).



Διάγραμμα 7.1 Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε χαρακτηρισμένες PPO με γνωστή τρισδιάστατη δομή. Οι ομοιότητα και η επικάλυψη (στην παρένθεση) παρουσιάζονται σε ποσοστά % για κάθε αλληλουχία σύμφωνα με τα αποτελέσματα του BLAST σε σύγκριση με την *Tt*PPO. Συντομογραφίες: PPO- polyphenol oxidase, CO- catechol oxidase, Tyr- tyrosinase, AUS- aurone synthase, Ao- *Aspergillus oryzae*, Bm- *Bacillus megaterium*, Sc- *Streptomyces castaneoglobisporus*, Ib- *Iponomea batatas*, Cg- *Coreopsis grandiflora*, Vv- *Vitis vinifera*, Jr- *Juglans regia*, Tr- *Trichoderma reesei*, Pa- *Polyporus arcularius*, Pn- *Pholiota nameko*, Ab- *Agaricus bisporus*.

T. thermophila PPO

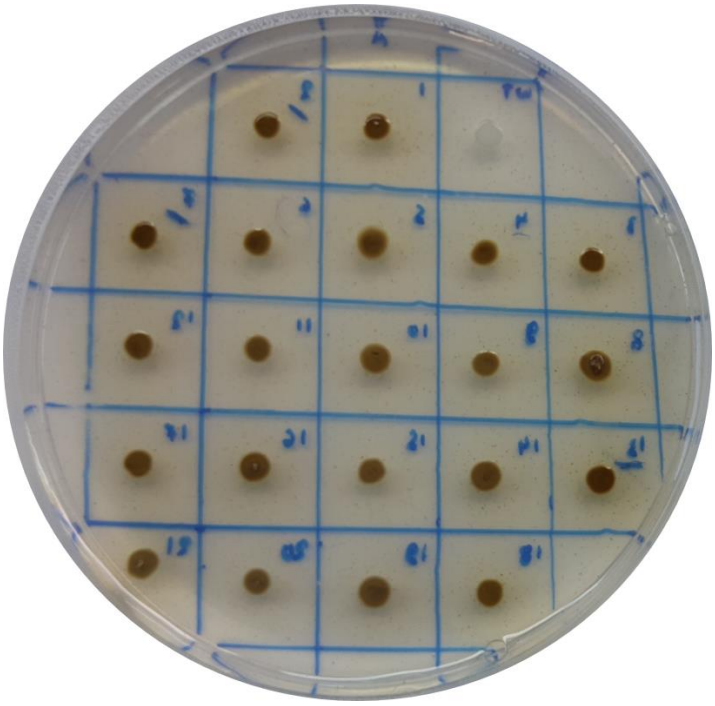
Το δέντρο σχεδιάστηκε σε κλίμακα, με τα μήκη των κλαδιών να μετριούνται από τον αριθμό των υποκαταστάσεων ανά θέση. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η *Tt*PPO ανήκει στο ίδιο κλαδί με την κατεχολοξειδάση του *A. oryzae*, με την οποία και έχει την υψηλότερη ομοιότητα. Αυτές οι δύο μυκητιακές PPO είναι πιο όμοιες με τις βακτηριακές τυροσινάσες παρά με τις μυκητιακές τυροσινάσες. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι φυτικές PPO σχηματίζουν μια ξεχωριστή κατηγορία η οποία βρίσκεται πιο κοντά με τις βακτηριακές και μυκητιακές PPO.

Το cDNA της υποθετικής πρωτεΐνης κλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης *p*PICZαA της *P. pastoris* υπό τη ρύθμιση του υποκινητή *AOX1*. Η ώριμη πρωτεΐνη είχε προβλεπόμενο μοριακό βάρος 46464 Da και ισοηλεκτρικό σημείο 5.34, ενώ εμφάνισε 3 πιθανά σημεία *N*-γλυκοζυλίωσης και 7 *O*-γλυκοζυλίωσης.

Τα περισσότερα γονίδια μυκητιακών τυροσινασών κωδικοποιούν μία προ-τυροσινάση, η οποία δεν είναι ενεργή μέχρι να κοπεί πρωτεολυτικά στο καρβοξυτελικό της άκρο. Τα προένζυμα αυτά έχουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 66 έως 71 kDa, ενώ τα ώριμα ένζυμα 42-45 kDa (Fujieda et al., 2012; Halaouli et al., 2006; Kawamura-Konishi et al., 2007; Marková et al., 2016; Rao et al., 2011; Selinheimo et al., 2006; J. Wu et al., 2010). Αυτή η ωρίμανση συμβαίνει φυσικά κατά την ομόλογη (Kawamura-Konishi et al., 2007; Selinheimo et al., 2006) ή ετερόλογη έκφραση σε ευκαρυωτικούς ξενιστές (Halaouli et al., 2006; Westerholm-Parvinen et al., 2007), σε αντίθεση με τους προκαρυωτικούς. Η μόνη PPO, εκτός της *Tt*PPO, που δε χρειάζεται επεξεργασία στο άκρο της αυτό είναι η κατεχολοξειδάση του *A. oryzae* (*Ao*CO).

7.1.2 Έκφραση και απομόνωση της *Tt*PPO

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα *P. pastoris* που έδειξαν αντοχή στη ζεοσίνη αναπτύχθηκαν σε βασικό θρεπτικό μέσο με μεθανόλη και αφέθηκαν να αναπτυχθούν 3 ημέρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε δοκιμασία οξείδωσης της 4-CP και οι αποικίες που την οξείδωναν εντοπίστηκαν από το σκούρο καφέ χρώμα που εμφανίστηκε πάνω και γύρω από τις αποικίες, σε αντίθεση με το μη μετασχηματισμένο στέλεχος (Εικόνα 7.1).



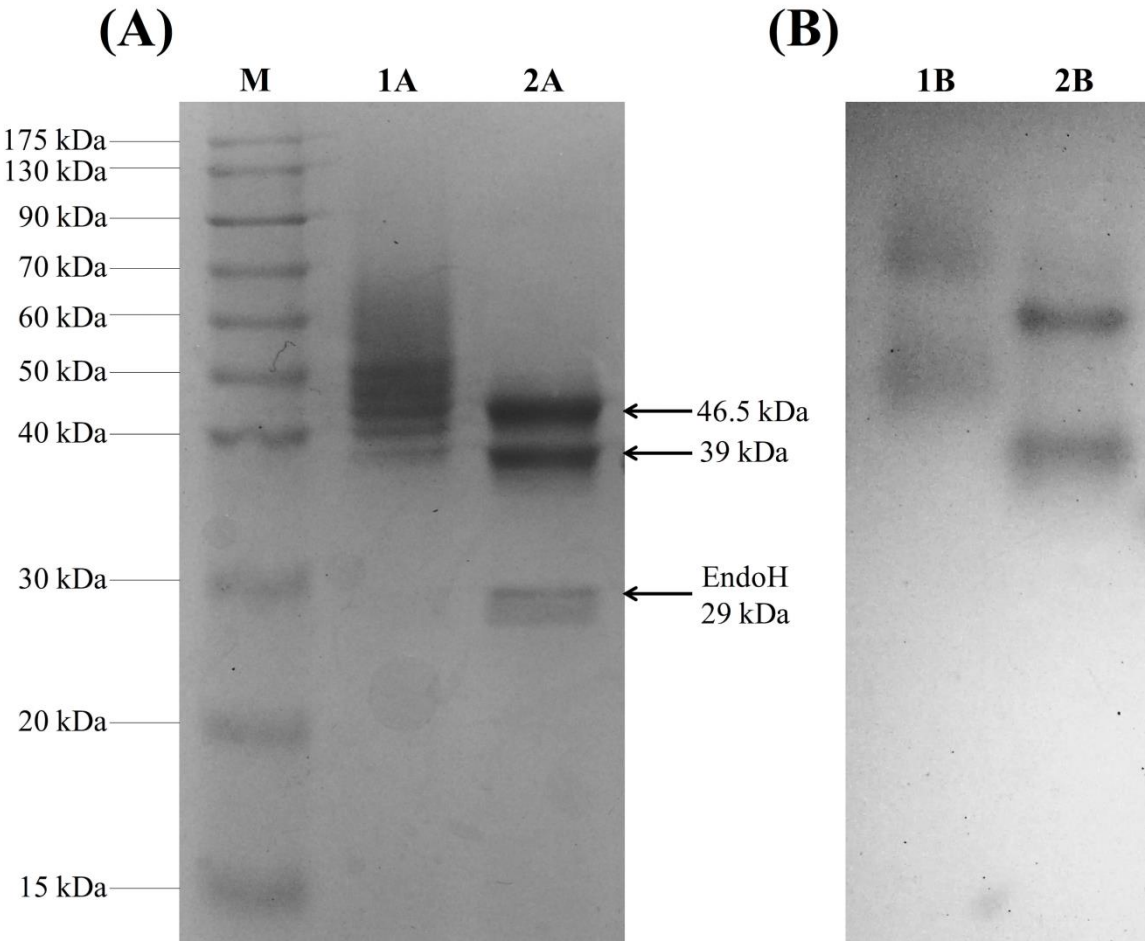
Εικόνα 7.1 Δοκιμασία τρυβλίου για εντοπισμό ενεργότητας των μετασχηματισμένων αποικιών σε σύγκριση με το φυσικό στέλεχος *P. pastoris* X-33 (πάνω δεξιά τετράγωνο) για τον εντοπισμό ενεργότητας PPO.

Επτά αποικίες που φάνηκε να σχηματίζουν εντονότερο χρώμα από τις υπόλοιπες καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο. Δείγματα από τις καλλιέργειες λαμβάνονταν καθημερινά και η εξωκυτταρική ενεργότητα μετρούταν, καθώς και η κυτταρική ανάπτυξη. Η ενζυμική ενεργότητα μεγιστοποιήθηκε την 4^{η} ημέρα επαγωγής, ενώ τα φυσικά στελέχη X-33 δεν εμφάνισαν καθόλου ενεργότητα. Το στέλεχος που παρουσίασε την υψηλότερη ενεργότητα χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω μελέτες.

Η διαθεσιμότητα χαλκού κατά τη διάρκεια της παραγωγής της ανασυνδυασμένης *Tt*PPO μπορεί να αποδειχθεί ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη δραστικότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης καθώς αυτή περιέχει δύο ιόντα χαλκού ανά πρωτεϊνικό μόριο. Συνεπώς, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων $CuSO_4$ (0-100 μM) στο μέσο καλλιέργειας στην παραγόμενη ενζυμική δραστικότητα. Η υψηλότερη δραστικότητα παρατηρήθηκε σε 25 μM $CuSO_4$, ενώ απουσία προστιθέμενων ιόντων χαλκού η δραστικότητα

ήταν πολύ χαμηλή. Η επίδραση του μέσου καλλιέργειας και της θερμοκρασίας επαγωγής στη δραστικότητα του παραγόμενου ανασυνδυασμένου ενζύμου έδειξε ότι ένα σύνθετο μέσο (BMMY) και χαμηλή θερμοκρασία επαγωγής (23 ^{o}C) είχαν ως αποτέλεσμα υψηλότερη παραγωγή PPO.

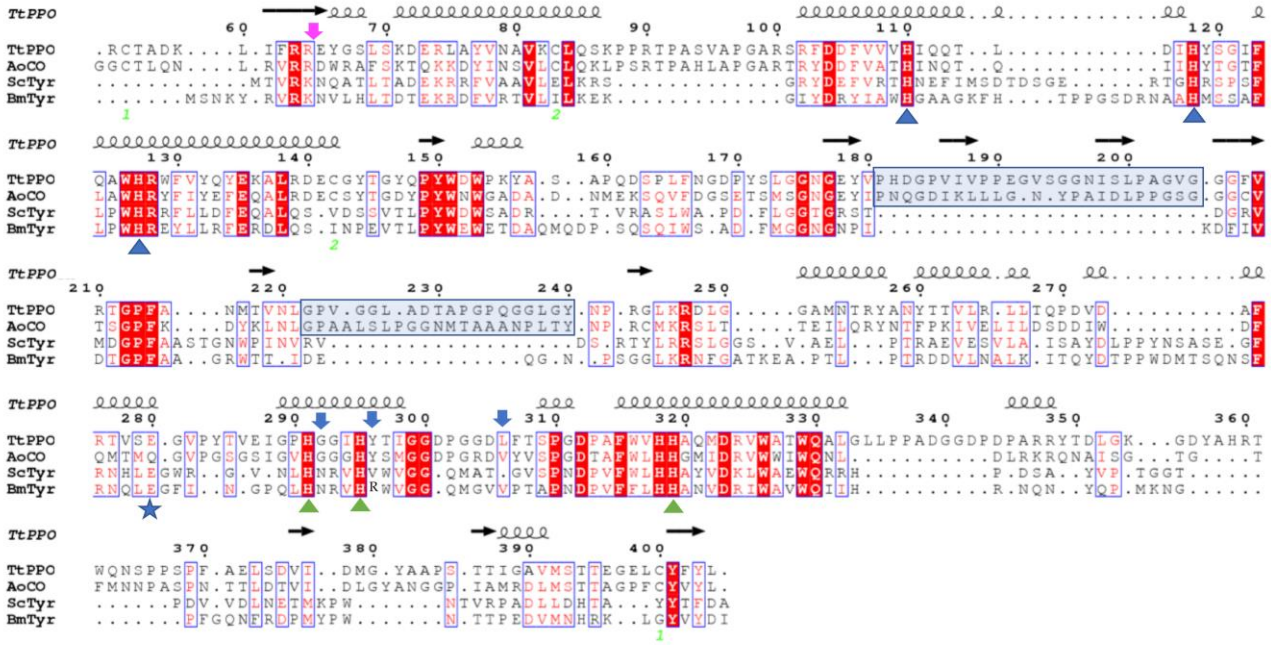
Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρήση χρωματογραφίας ακινητοποιημένων ιόντων μετάλλου (IMAC) από το συμπυκνωμένο υπερκείμενο καλλιέργειας με απόδοση 39,4 mg L^{-1} καλλιέργειας. Η ομοιογένεια του καθαρισμένου ενζύμου ελέγχθηκε με SDS-PAGE, όπου η *Tt*PPO εμφανίζεται ως μίγμα, με αρκετές διακεκριμένες ζώνες κυμαινόμενες από 39-50 kDa (Εικόνα 7.2A). Μετά από απογλυκοζυλίωση με ενδογλυκοσιδάση H που δρα σε θέσεις *N*-γλυκοζυλίωσης, όλες αυτές οι ζώνες συγχωνεύονται σε μόνο δύο, μία στα 46,5 kDa και μία στα 39 kDa περίπου. Η άνω ζώνη αντιστοιχεί στο θεωρητικό μοριακό βάρος της *Tt*PPO. Η κάτω ζώνη είναι περίπου 7,5 kDa μικρότερη από το υπολογισμένο μοριακό βάρος. Το κομμένο πεπτίδιο κατά πάσα πιθανότητα προέρχεται από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, καθώς το καρβοξυτελικό που περιέχει το His-tag παραμένει άθικτο, αφού η πρωτεΐνη συγκρατείται στη στήλη συγγένειας. Η χρώση δραστικότητας (Εικόνα 7.2B) έδειξε ότι αμφότερες οι ζώνες είναι ενεργές πριν (1B) και μετά (2B) από απογλυκοζυλίωση.



Εικόνα 7.2 SDS-PAGE γέλη της καθαρής *Tt*PPO. Τα δείγματα έτρεξαν κάτω από (A) αποδιατακτικές είτε (B) φυσικές συνθήκες. Λωρίδες: M, πρότυπα μοριακά βάρη; 1A και 1B, ανεπεξέργαστη *Tt*PPO; 2A και 2B, απογλυκοζυλιωμένη *Tt*PPO.

Η πρωτεολυμένη μορφή της *Tt*PPO μπορεί να είναι το προϊόν της ενδο-πρωτεάσης Kex2, η οποία παράγεται από το στέλεχος *P. pastoris* προκειμένου να υδρολύσει τη σηματοδοτική αλληλουχία. Αυτή η πεπτιδάση αναγνωρίζει την αλληλουχία αμινοξέων N – K/R-R – C και τη διασπά στο καρβοξυτελικό άκρο της. Υποθέτουμε ότι αυτή η πρωτεάση αποκόπτει όχι μόνο την αλληλουχία σήματος, αλλά και μετά το 64° αμινοξύ της ώριμης πρωτεΐνης, αναγνωρίζοντας μια δεύτερη θέση διάσπασης (R-R, φούξια βέλος στην Εικόνα 7.3). Στην περίπτωση αυτή, η προκύπτουσα πρωτεΐνη στερείται 7,2 kDa, η οποία είναι περίπου η διαφορά που παρατηρείται στην πηκτή SDS. Οι περαιτέρω μελέτες

διεξήχθησαν με το μείγμα των δύο μορφών της *Tt*PPO, καθώς και οι δύο αποδείχθηκαν ενεργές.



Εικόνα 7.3 Ευθυγράμιση αλληλουχίας με βάση τη δομή για τις *Tt*PPO, *Ao*CO (PDB ID: 4J3R), *Sc*Tyr (PDB ID: 1WX2) και *Bm*Tyr (PDB ID: 3NM8). Οι ιστιδίνες που συντονίζουν τα ιόντα χαλκού υποδεικνύονται με τα μπλε τρίγωνα για τον χαλκό A (CuA) και πράσινα τρίγωνα για τον χαλκό B (CuB). Τα αμινοξέα που έχουν μεταλλαχθεί υποδεικνύονται με τα μπλε βέλη. Το πιθανό σημείο πέψης της πρωτεάσης στο αμινοτελικό άκρο υποδεικνύεται με φούξια βέλος. Τα μπλε πλαίσια υποδεικνύουν εισαγωγές που υπάρχουν στις αλληλουχίες των *Tt*PPO και *Ao*CO.

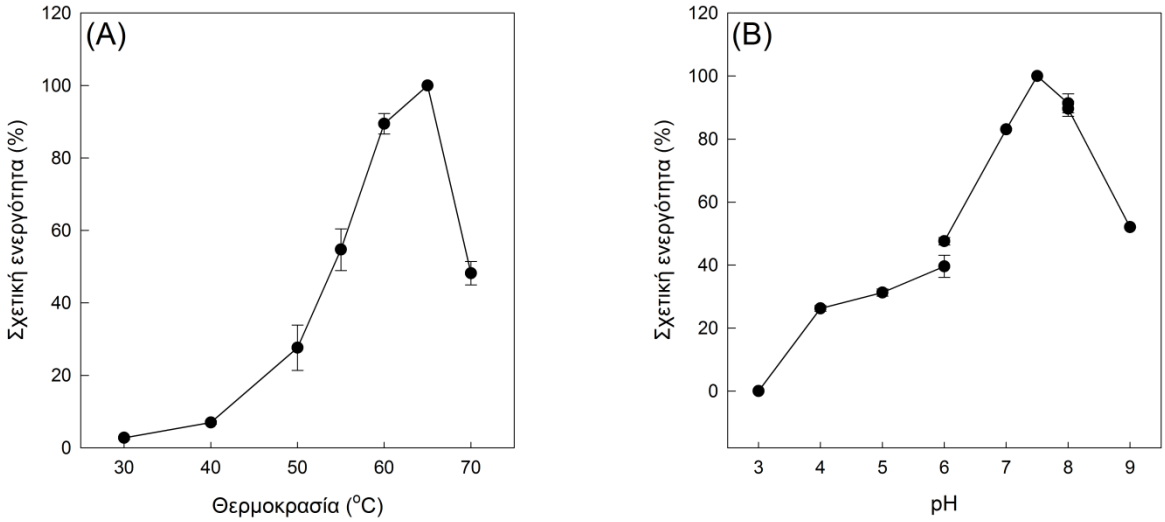
Η *Tt*PPO και η *Ao*CO είναι οι μόνες γνωστές που δεν πρωτεολύονται στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα ένζυμα υφίστανται πρωτεόλυση αρκετών αμινοξέων στο αμινοτελικό τους άκρο (51 aa για την *Ao*CO και 64 aa για την *Tt*PPO) από πρωτεάση της οικογένειας Kex2/furin, που επίσης κόβουν τα αντίστοιχα πεπτίδια σηματοδότες (Gasparetti et al., 2010). Δεν είναι ξεκάθαρο αν το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα μόνο στους ετερόλογους ξενιστές (*P. pastoris* για την *Tt*PPO και *T. reesei* για την *Ao*CO) ή και στους ομόλογους παραγωγούς. Για την *Ao*CO το θεωρητικό μοριακό βάρος ήταν 44,3 kDa αλλά

εμφανίστηκαν και 2 άλλες μπάντες στα 39,3 και 40,5 kDa, που ήταν επίσης ενεργές και εμφάνισαν την ίδια ειδική ενεργότητα με το μη πρωτεολυμένο ένζυμο.

7.2 Χαρακτηρισμός της ανασυνδυασμένης *Tt*PPO

7.2.1 Βέλτιστες συνθήκες δράσης – Θερμοσταθερότητα

Η θερμοκρασία στην οποία η ανασυνδυασμένη PPO παρουσίασε τη μέγιστη ενεργότητά της ήταν οι 65 ^{o}C (Διάγραμμα 7.2A), αλλά επίσης έδειξε και ικανοποιητική ενεργότητα σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 55-70 ^{o}C (πάνω από 50% της μέγιστης).

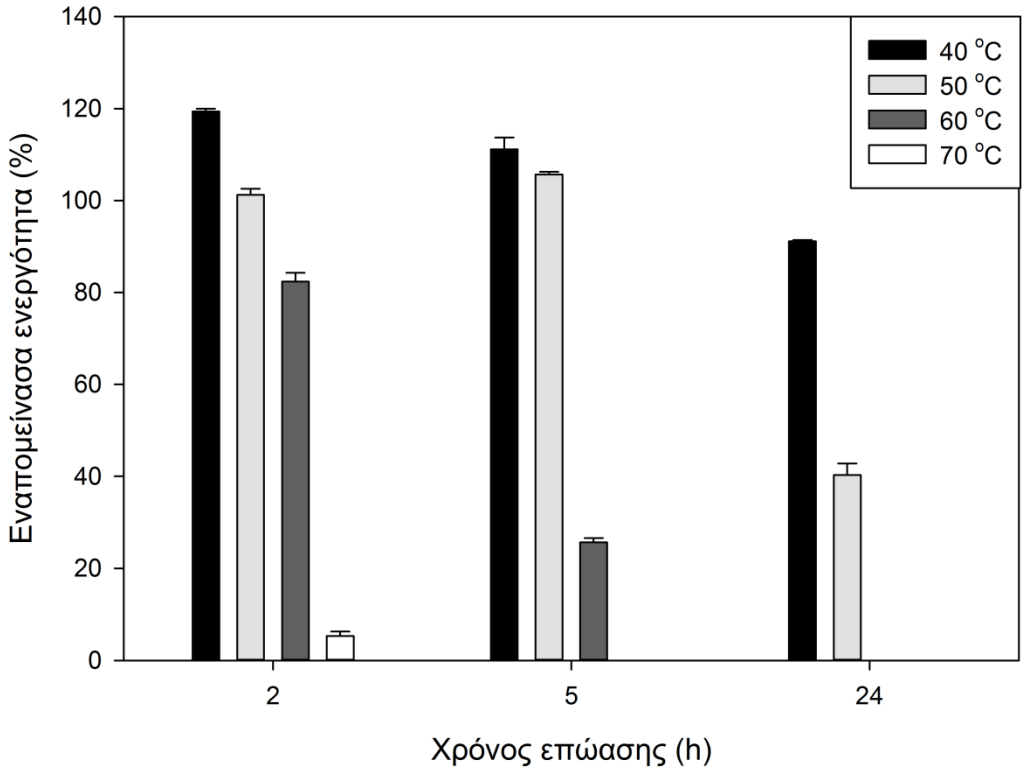


Διάγραμμα 7.2 Επίδραση της θερμοκρασίας (A) και του pH (B) στην ενεργότητα του απομονωμένου ανασυνδυασμένου ενζύμου. Η συγκέντρωση ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 8,6 μg mL^{-1}.

Εκτεταμένη επώαση της *Tt*PPO σε αυτές τις θερμοκρασίες είχε σαν αποτέλεσμα πτώση πάνω από 70% της αρχικής ενεργότητας στους 60 ^{o}C και πάνω από 90% στους 70 ^{o}C, μετά από 5 και 2 h επώασης αντίστοιχα (Διάγραμμα 7.3). Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, το ένζυμο ήταν σταθερό για τουλάχιστον 5 h και υπέστη μικρές απώλειες (<10%) μετά από 24 h στους 40 ^{o}C, ενώ ο χρόνος ημιζωής του ήταν 18.3 h και 2.5 h στους 50 ^{o}C και 60 ^{o}C αντίστοιχα.

T. thermophila PPO

Η ενεργότητα της *Tt*PPO ήταν μέγιστη σε pH 7-8, ενώ πάνω από 50% σε pH 6-9 (Διάγραμμα 7.2B).



Διάγραμμα 7.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ανασυνδυασμένου ενζύμου στους 40 (λευκό), 50 (ανοιχτό γκρι), 60 (σκούρο γκρι) και 70 (μαύρο) °C. το ένζυμο επωάστηκε σε συγκέντρωση 1,1 mg mL-1.

Η βέλτιστη θερμοκρασία για κάποιες χαρακτηρισμένες μυκητιακές τυροσινάσες είναι 50 ^{o}C (Cabrera-Valladares et al., 2006; Marková et al., 2016; Shuster and Fishman, 2009). Η *Tt*PPO εμφανίζει την υψηλότερη βέλτιστη θερμοκρασία στη βιβλιογραφία. Επίσης, το βέλτιστο pH για τις περισσότερες χαρακτηρισμένες τυροσινάσες κυμαίνεται τυπικά στην ελαφρά όξινη και ουδέτερη περιοχή (Cabrera-Valladares et al., 2006; Gasparetti et al., 2010; Marková et al., 2016; Shuster and Fishman, 2009; Westerholm-Parvinen et al., 2007), εκτός από την τυροσινάση του *T. reesei* (pH 9) (Selinheimo et al., 2006) και την *Tt*PPO (pH 7.5-8). Επιπρόσθετα, η *Tt*PPO εμφάνισε ανώτερη

θερμοσταθερότητα σε σύγκριση με τη μυκητιακή τυροσινάση του *T. reesei* (Selinheimo et al., 2006) και τις βακτηριακές από *R. etli* (Cabrera-Valladares et al., 2006) και *R. solanacearum* (Hernandez-Romero et al., 2006), αλλά παρόμοια με αυτήν του *A. oryzae* ($t_{1/2}^{60}$=2 h).

7.2.2 Εύρος υποστρωμάτων

Η ανασυνδυασμένη *Tt*PPO εμφανίζει ενεργότητα σε ένα ευρύ φάσμα φαινολικών ενώσεων. Οι κινητικές σταθερές προσδιορίστηκαν για 7 υποστρώματα και παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.1. Η *Tt*PPO έδειξε τη μεγαλύτερη καταλυτική συγγένεια για την 4-CP ακολουθούμενη από τη βανιλλίνη και την L-DOPA. Οι υψηλότερες τιμές K_M βρέθηκαν για την υδροκινόνη, κατεχίνη και κατεχόλη. Από την άλλη, το ένζυμο έδειξε υψηλό αριθμό ανακύκλωσης (k_{cat}) στην κατεχίνη, 7 φορές περισσότερο από την 4-CP.

Πίνακας 7.1 Κινητικές σταθερές της *Tt*PPO σε διαφορετικά φαινολικά υποστρώματα. Στις παρενθέσεις παρουσιάζεται η τυπική απόκλιση κάθε τιμής.

Υπόστρωμα	k_{cat} **(min^{-1})**	K_M **(mM)**	k_{cat}/K_M **(min^{-1} mM^{-1})**
Κατεχόλη	131.4 (6.4)	27.0 (2.8)	4.9 (0.6)
4-Χλωροκατεχόλη	341.6 (9.7)	1.6 (0.1)	209.5 (14.8)
L-DOPA	6.5 (0.8)	2.2 (0.6)	3.0 (0.9)
Κατεχίνη	2428.7 (824.0)	31.0 (12.9)	78.3 (42.0)
Βανιλλίνη	115.3 (3.4)	2.0 (0.1)	59.2 (4.1)
Γουαϊακόλη	174.3 (9.7)	4.2 (0.6)	41.4 (6.1)
Υδροκινόνη	101.2 (5.9)	54.4 (5.5)	1.9 (0.1)

Εκτός από αυτά τα υποστρώματα, το ανασυνδυασμένο ένζυμο μπορούσε επίσης να οξειδώσει με γρήγορο ρυθμό 6 ακόμα υποστρώματα μεταξύ των οποίων παράγωγα της κατεχόλης, του διφαινυλίου και ναφθαλενίου.

Πίνακας 7.2 Ειδική ενεργότητα της *Tt*PPO σε διαφορετικά φαινολικά υποστρώματα. Η συγκέντρωση των υποστρωμάτων ήταν 5 mM. Στις παρενθέσεις παρουσιάζεται η τυπική απόκλιση κάθε τιμής.

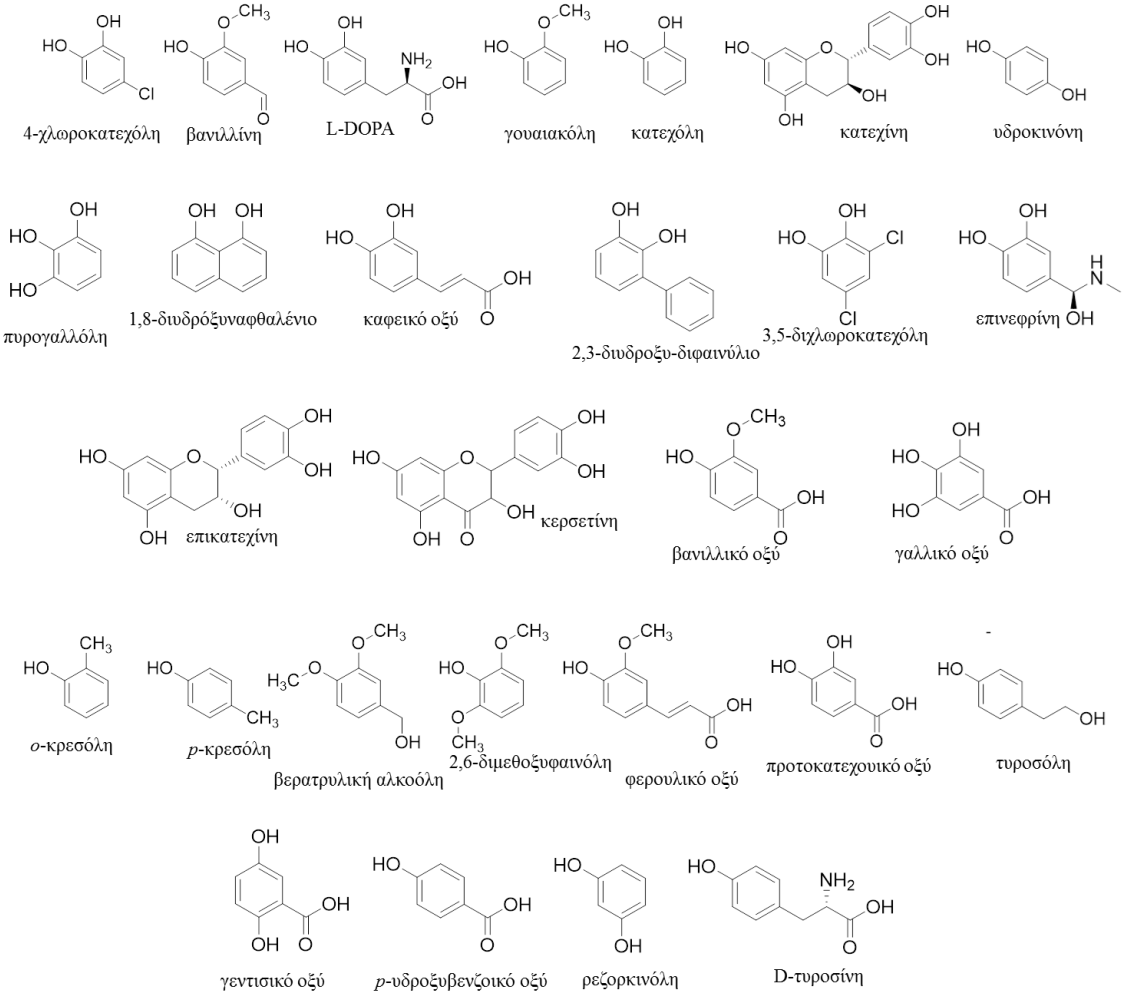
Υπόστρωμα	**Ειδική ενεργότητα (U/g)**
3,5-Διχλωροκατεχόλη	174.4 (8.9)
Καφεϊκό οξύ	328.0 (7.5)
Επινεφρίνη	128.7 (2.8)
2,3-Διυδρόξυ διφαινύλιο	192.8 (1.8)
Πυρογαλλόλη	672.7 (43.7)
1,8-Διυδρόξυ ναφθαλένιο	621.7 (2.6)

Επιπρόσθετα, η *Tt*PPO παρουσίασε χαμηλή ενεργότητα σε άλλα παράγωγα της κατεχόλης, γουαϊακόλης και φαινόλης μεταξύ αυτών και στις κρεσόλες (Πίνακας 7.2), οι οποίες έχουν πιθανές αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Ακόμα, το ένζυμο είχε περιορισμένη ενεργότητα σε ένα μη φαινολικό υπόστρωμα, τη βερατρυλική αλκοόλη.

Πίνακας 7.3 Σχετική ενεργότητα της TtPPO σε διάφορα υποστρώματα σε σύγκριση με την ενεργότητα στην κατεχόλη (100%). Η ειδική ενεργότητα σε κατεχόλη ήταν 0,34 U/mg. Η συγκέντρωση όλων των υποστρωμάτων ήταν 5 mM. Οι αντιδράσεις τερματίστηκαν μετά από 20 h στους 35 °C.

Υπόστρωμα	**Σχετική ενεργότητα (%)**
Πολυφαινόλες	
Επικατεχίνη	140
Κερσετίνη	59
Κατεχολικό παράγωγο	
Πρωτοκατεχουικό οξύ	11
Παράγωγα του βενζοτριολίου	
Γαλλικό οξύ	20
Παράγωγα γουαϊακόλης	
Βανιλλικό οξύ	32
Φερουλικό οξύ	11
Συριγκόλη	12
Υδροξυλιωμένα φαινολικά	
Ρεζορκινόλη	1
Γεντισικό οξύ	3
Παράγωγα φαινόλης	
o-Κρεσόλη	23
p- Κρεσόλη	11
p-Υδρόξυβενζολικό οξύ	3
p-Υδροξυφαινυλοξικό οξύ	0
p-Τυροσόλη	10
L-Τυροσίνη	0
D- Τυροσίνη	1
Μη φαινολικά	
Βερατριλική αλκοόλη	14

Οι δομές από όλα τα υποστρώματα που μπορούσε να οξειδώσει η *Tt*PPO παρουσιάζονται στην παρακάτω Εικόνα. Συνολικά η *Tt*PPO μπόρεσε να οξειδώσει 28/30 ενώσεις που δοκιμάστηκαν.



Εικόνα 7.4 Χημικές δομές των ενώσεων που οξειδώνει η *Tt*PPO.

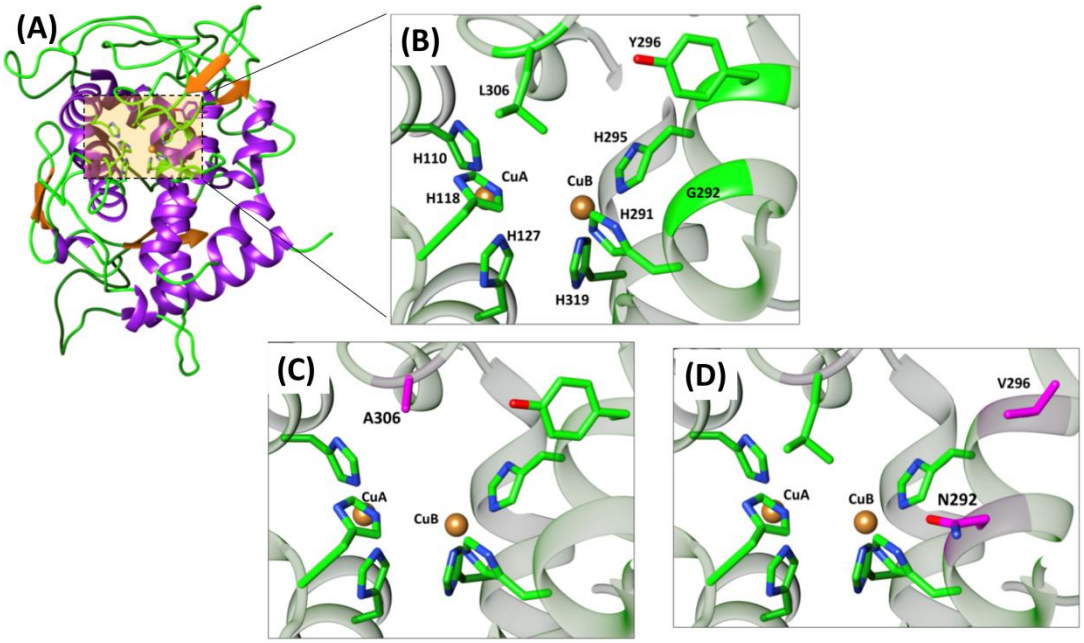
Πρόσφατες έρευνες σχετικά με τις δομές των PPO, καθώς και την επίδραση μεταλλάξεων στην ενεργότητά τους, έχουν βελτιώσει πολύ την κατανόησή μας για αυτή την οικογένεια των ενζύμων (Decker et al., 2018; Kanteev et al., 2015). Στην περίπτωσή μας, παρόλο που η *Tt*PPO δεν μπορούσε να οξειδώσει την L-τυροσίνη (όπως οι κλασικές τυροσινάσες), είχε τη δυνατότητα να υδροξυλιώσει άλλα μονοφαινολικά υποστρώματα όπως η φαινόλη, η κρεσόλη και η τυροσόλη. Επίσης, μπορούσε να οξειδώσει το 1,8-διυδρόξυ-ναφθαλένιο το οποίο είναι μία συνήθης πρόδρομη ένωση για τον σχηματισμό μελανίνης στην *T. thermophila*. Έτσι, σε αυτή τη μελέτη επιβεβαιώσαμε ότι η δράση υδροξυλίωσης είναι μια γενική λειτουργία των PPO και δε θα πρέπει να σχετίζεται μόνο με την

ενεργότητα σε τυροσίνη. Η κατεχολοξειδάση (όπως την ονόμασαν αυτοί που την ανακάλυψαν) από τον *A. oryzae* εμφανίζει επίσης ενεργότητα σε ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, το οποίο περιελάμβανε πολυφαινολικά, κατεχολικά και φαινολικά (αμινοφαινόλη, γουαϊακόλη, φαινόλη, τυροσόλη, κρεσόλη) παράγωγα, αλλά και μη φαινολικά (ανιλίνη), παρότι δεν μπορούσε να οξειδώσει την τυροσίνη και τη DOPA (Gasparetti et al., 2010). Η τυροσινάση του *T. reesei* έδειξε προτίμηση σε παρα-υποκατεστημένες φαινόλες σε σύγκριση με τα όρθο- ισομερή τους και μπορούσε επίσης να οξειδώσει την ανιλίνη, η οποία δεν περιέχει υδροξυλομάδα στο δακτύλιο (Selinheimo et al., 2006). Τέλος, η τυροσινάση του *B. megaterium* εμφάνισε ενεργότητα σε πολλά υποστρώματα, αλλά σχετικά χαμηλή δραστηκότητα σε φαινολικά παράγωγα (εκτός της τυροσίνης) σε σχέση με τα κατεχολικά (Shuster and Fishman, 2009).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο λόγος ενεργοτήτων μονοφαινολάσης/διφαινολάσης αυτών των ενζύμων υπολογίζεται με βάση την ενεργότητά τους σε L-τυροσίνη/L-DOPA και είναι συνήθως <1 (Kawamura-Konishi et al., 2007; Lezzi et al., 2012; Marková et al., 2016; Shuster and Fishman, 2009). Ο λόγος αυτός για την τυροσινάση του *T. reesei* υπολογίστηκε σε φαινόλη/κατεχόλη και ήταν 0,1 (Selinheimo et al., 2006), δηλαδή 5 φορές μεγαλύτερος από ότι για την *Tt*PPO. Εξαίρεση σε αυτές τις περιπτώσεις είναι μία βακτηριακή τυροσινάση για την οποία ο λόγος μονοφαινολάσης/διφαινολάσης ήταν πάνω από 1 (Hernandez-Romero et al., 2006). Επιτυχείς προσπάθειες για την αύξηση του λόγου αυτού έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τεχνικές μετάλλαξης σημείου. Τροποποιήσεις στην αμινοξική αλληλουχία της τυροσινάσης του *B. megaterium* έδειξαν αυξημένο λόγο κατά 1.7-9 φορές (Goldfeder et al., 2013; Shuster Ben-Yosef et al., 2010). Παρόλα αυτά, η μελέτη μας εστίασε στην επίδραση σημειακών μεταλλάξεων για την αύξηση της ενεργότητας της *Tt*PPO σε CPs, με σκοπό τη δημιουργία ενός κατάλληλου βιοκαταλύτη για εφαρμογή στη Βιοεξυγίανση.

7.3 Κατασκευή μοντέλου και επιλογή σημειακών μεταλλάξεων

Η αμινοξική αλληλουχία της ανασυνδυασμένης *Tt*PPO καταχωρήθηκε στο διακομιστή HHpred για εύρεση ομόλογων πρωτεϊνών με γνωστές τριτοταγείς δομές. Η καταχώρηση PDB με το υψηλότερο σκορ ήταν αυτή της κατεχολοξειδάσης του *A. oryzae* (*Ao*CO, PDB ID: 4J3R). Η *Ao*CO, όπως έχει αναφερθεί, έχει 45% ομοιότητα για 82% επικάλυψη με την *Tt*PPO και έχει E-value πρακτικά 0. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε ως πρότυπο για την κατασκευή του δομικού μοντέλου της *Tt*PPO από το λογισμικό Modeller (Εικόνα 7.5).



Εικόνα 7.5(A) Αναπαράσταση ολόκληρης της δομής του μοντέλου της *Tt*PPO. Το ενεργό κέντρο περικλείεται στο μπεζ πλαίσιο. (B) Το ενεργό κέντρο του ενζύμου με τις ιστιδίνες που συντονίζουν τους χαλκούς και τα αμινοξέα που μεταλλάχθηκαν (με πράσινο). (C) Ενεργό κέντρο του L306A. (D) Ενεργό κέντρο του G292N/Y296V.

Η *Tt*PPO, όπως και η *Ao*CO, ανήκει στις «μικρές τυροσινάσες», οι οποίες δεν έχουν τον καρβοξυτελικό τομέα (Gasparetti et al., 2010). Περιλαμβάνει το διατηρημένο κατάλοιπο αργινίνης (R63) και το μοτίβο τυροσίνης (Y401-F402-Y403), το οποίο στην περίπτωση φυτικών και μυκητιακών PPO σηματοδοτεί το

τέλος του καταλυτικού τομέα και την αρχή της συνδετικής περιοχής. Αυτά τα αμινοξέα είναι τοποθετημένα σε δύο παράλληλα β-φύλλα και γεφυρώνουν το αμινο- με το καρβοξυ-τελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με σχηματισμό αλληλεπιδράσεων π-κατιόντων και β-φύλλων (Marusek et al., 2006). Τα δύο ιόντα χαλκού συντονίζονται από 6 ιστιδίνες: His110 (H_{A1}), His118 (H_{A2}) και His127 (H_{A3}) για τον CuA, και His295 (H_{B1}), His291 (H_{B2}) και His319 (H_{B3}) για τον CuB (Εικόνα 7.5B). Από τις τρεις δισουλφιδικές γέφυρες που υπάρχουν στην *Ao*CO, οι δύο φαίνεται να είναι συντηρημένες στην *Tt*PPO, ανάμεσα στις κυστεΐνες Cys55-Cys400 και Cys83-Cys142. Η *Tt*PPO, όπως και η *Ao*CO, περιέχει δύο ενθέσεις (αμινοξέα 181-205 και 222-240), οι οποίες λείπουν από τις δομές των *Sc*Tyr και *Bm*Tyr (Εικόνα 7.3). Αυτά τα πρόσθετα αμινοξέα σχηματίζουν εκτεταμένους βρόγχους πάνω από το ενεργό κέντρο περιορίζοντας έτσι την πρόσβαση σε αυτό.

Με σκοπό να αποκαλυφθούν τα δομικά χαρακτηριστικά των PPO που επηρεάζουν τις λειτουργικές τους ιδιότητες, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες οι οποίες εστίαζαν στα αμινοξέα της περιοχής του ενεργού κέντρου (Goldfeder et al., 2013; Solem et al., 2016). Σημαντικές αλλαγές παρατηρήθηκαν στην περιοχή γύρω από τον CuA, ο οποίος πιστεύεται ότι καθορίζει την εξειδίκευση του ενζύμου (Kanteev et al., 2015). Η προσβασιμότητα της περιοχής του CuA είχε υποτεθεί ότι ήταν καθοριστικός παράγοντας για την ενεργότητα μονοφαινολάσης (Gasparetti et al., 2010). Στην *Tt*PPO, ο CuA καλύπτεται από μία λευκίνη (L306). Για να μελετήσουμε την επίδραση του αμινοξέος αυτού στην ενεργότητα της *Tt*PPO η L306 μεταλλάχτηκε σε αλανίνη (L306A) (Εικόνα 7.5C).

Όσον αφορά τα αμινοξέα που περιβάλλουν τον CuB, η R209 στην *Bm*Tyr, η οποία βρίσκεται μετά την H_{B2}, έχει προταθεί ότι είναι κρίσιμη για τον προσανατολισμό του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο (Sendovski et al., 2011). Το αντίστοιχο αμινοξύ στην *Tt*PPO είναι μία τυροσίνη (Y296), όπως και στην *Ao*CO, ενώ στην *Sc*Tyr είναι βαλίνη. Ένα άλλο αμινοξύ το οποίο πιθανό να είναι καθοριστικό για την εξειδίκευση στο υπόστρωμα είναι αυτό δίπλα στην ιστιδίνη H_{B1}. Έχει φανεί ότι η παρουσία μιας ασπαραγίνης σε αυτό το σημείο μπορεί να καθορίζει τη δράση μονοφαινολάσης (Solem et al., 2016). Στην περίπτωση της *Tt*PPO, το αντίστοιχο αμινοξύ είναι μία γλυκίνη (G292) όπως και στην *Ao*CO. Για

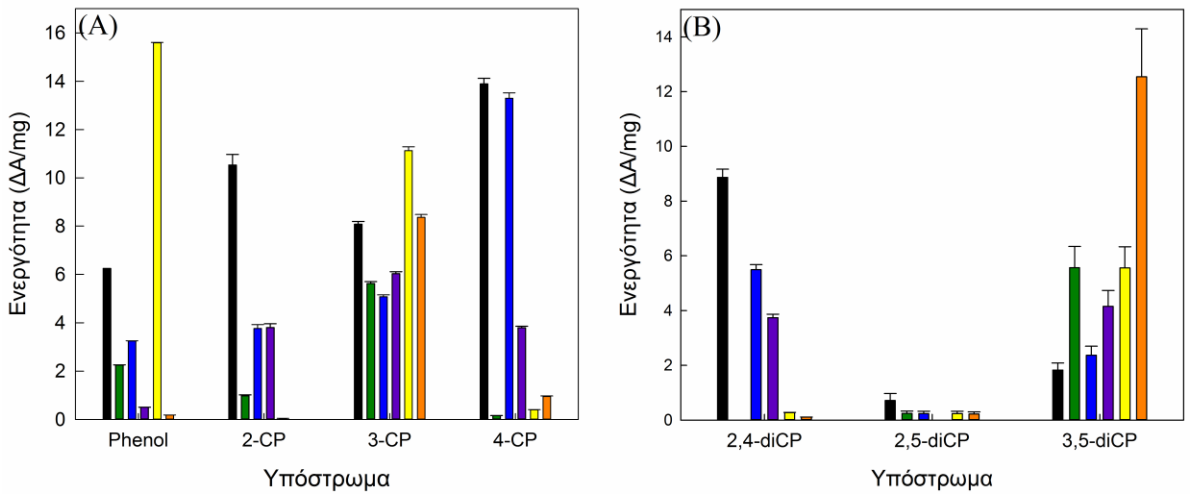
τη μελέτη του ρόλου των προαναφερθέντων αμινοξέων στα βιοχημικά χαρακτηριστικά της *Tt*PPO, τα μεταλλάγματα Y296V και G292N (Εικόνα 7.5B και 7.5D), όπως επίσης και το L306A εκφράστηκαν και χαρακτηρίστηκαν.

7.4 Απομάκρυνση χλωροφαινολών με τις τροποποιημένες *Tt*PPO

Οι PPOs και οι λακκάσες έχουν δείξει δυνατότητες για περιβαλλοντικές εφαρμογές και συγκεκριμένα για την αποτοξικοποίηση φαινολικών ενώσεων από λύματα, μιας και εμφανίζουν μεγάλο εύρος υποστρωμάτων που χρησιμοποιούν και το μόνο που απαιτούν είναι μοριακό οξυγόνο. Οι λακκάσες συγκεκριμένα, έχουν μελετηθεί εκτενώς στον συγκεκριμένο τομέα, κυρίως για τον αποχρωματισμό συνθετικών βαφών (Kudanga et al., 2017; Senthivelan et al., 2016). Από την άλλη, είναι ελάχιστες οι αναφορές για τις δυνατότητες των τυροσινασών στο πεδίο της βιοεξυγίανσης (Ba and Vinoth Kumar, 2017). Παρόλα αυτά, οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν στην ακινητοποίηση της εμπορικής τυροσινάσης του *Agaricus bisporus* για τη βιομετατροπή φαινόλης, δισφαινολών και *p*-κρεσόλης. Πολύ λίγες ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει βακτηριακές τυροσινάσες από στελέχη *Bacillus* και *Streptomyces* στην ελεύθερη (El-Shora and Metwally, 2008; Marino et al., 2011) ή ακινητοποιημένη τους μορφή (Roy et al., 2014) για τη βιομετατροπή της φαινόλης και των CPs. Η τυροσινάση του *Streptomyces antibioticus* ήταν ενεργή στις 3-CP και 4-CP αλλά όχι στη 2-CP, καθώς αυτή αποδείχθηκε ότι είναι παρεμποδιστής του ενζύμου (Marino et al., 2011), σε αντίθεση με την *Tt*PPO η οποία μπορεί να οξειδώσει και τη 2-CP. Η τυροσινάση αυτή έδινε ως προϊόν και των δύο CPs την 4-χλωρο-1,2-*ορθο*-κινόνη, η οποία υφίσταται πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση στο άτομο του χλωρίου και σχηματίζει ένα διμερές φαινόλης-κινόνης, παρουσία περίσσειας φαινόλης. *In silico* μελέτες πρόσδεσης έδειξαν ότι ο συντονισμός των 3-CP και 4-CP συμβαίνει στον CuB και η *ορθο*-υδροξυλίωση συμβαίνει μόνο στη θέση C6 του δακτυλίου. Μέχρι σήμερα, υπάρχει μόνο μία αναφορά για βελτίωση της ενεργότητας κάποιας PPO σε CPs και συγκεκριμένα στην 4-CP (Davis et al., 2018). Οι ερευνητές αυτοί κατασκεύασαν ένα μετάλλαγμα της τυροσινάσης του *Ralstonia solanacearum* με αυξημένη δυνατότητα μετατροπής διαφόρων 4-

αλογονοφαινολών στις αντίστοιχες 4-αλογονοκατεχόλες, σε σχέση με το φυσικό ένζυμο. Η συγκεκριμένη όμως εργασία στόχευε στην παραγωγή *ορθο*-διφαινολών, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρχικές ενώσεις για τη σύνθεση διαφόρων χημικών.

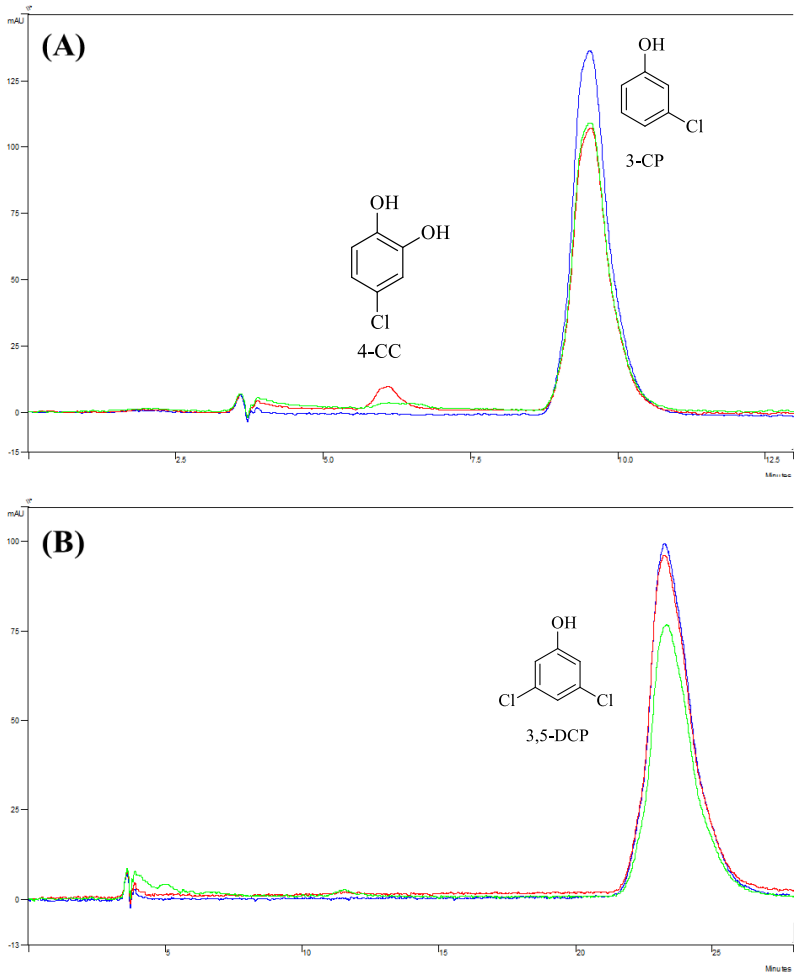
Με βάση φασματοφωτομετρική ανάλυση, το φυσικό ένζυμο *Tt*PPO εμφάνισε ενεργότητα στη φαινόλη και σε διάφορες μόνο- και δι-χλωροφαινόλες, με τη μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας στην 4-CP και τη χαμηλότερη στη 2,5-DCP. Το L306A έδειξε επίσης μέγιστη ενεργότητα για την 4-CP, ενώ τα υπόλοιπα μονά μεταλλάγματα (G292N and Y296V) ήταν πιο ενεργά στην 3-CP (Διάγραμμα 7.4A). Τα διπλά μεταλλάγματα έδειξαν μεταβολή στην εξειδίκευση υποστρώματος, το G292N/L306A προς τη φαινόλη και το G292N/Y296V προς την 3,5-DCP. Σε σύγκριση με το φυσικό ένζυμο, αυτά τα μεταλλάγματα επίσης έδειξαν υψηλότερη ενεργότητα στην 3-CP και 3,5-DCP, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 7.4 Ενεργότητα του φυσικού ενζύμου της *Tt*PPO (μαύρο, 43 μg mL^{-1}) και των μεταλλαγμάτων της G292N (πράσινο, 77 μg mL^{-1}), L306A (μπλε, 52 μg mL^{-1}), Y296V (μωβ, 52 μg mL^{-1}), G292N/L306A (κίτρινο, 50 μg mL^{-1}) και G292N/Y296V (πορτοκαλί, 54 μg mL^{-1}) μετρημένες μετά από 16 h στους 35 ^{o}C σε φαινόλη, μονο- (A) και δι-χλωροφαινόλες (B).

Για να γίνει ποσοτικοποίηση της κατανάλωσης των CPs σε κάθε αντίδραση, πραγματοποιήθηκε ανάλυση HPLC. Η 2,5-DCP εξαιρέθηκε από την ανάλυση

λόγω της πολύ χαμηλής ενεργότητας που είχε η *Tt*PPO και όλα τα μεταλλάγματά της σε αυτή. Το φυσικό ένζυμο έδειξε να είναι ο καλύτερος υποψήφιος για την απομάκρυνση των 2-CP, 4-CP και 2,4-DCP με αποδόσεις 35,4±0,2%, 25,2±0,3% και 25,5±1,5% αντίστοιχα. Στην περίπτωση της 3-CP, παρόλο που οι αρχικές αντιδράσεις έδειξαν ότι το G292N/L306A εμφανίζει 1,4 φορές αυξημένη ενεργότητα, η ποσοτικοποίηση έδειξε ότι οι αποδόσεις αυτού και του φυσικού στελέχους ήταν σχεδόν ίδιες (21,0±0,0% και 19,7±0,2% αντίστοιχα). Παρόλα αυτά, στην περίπτωση της αντίδρασης με το φυσικό στέλεχος φαίνεται να υπάρχει υπολειπόμενη χλωροκατεχόλη (23,3±0,1 μM) σύμφωνα με πρότυπα διαλύματα (Εικόνα 7.6A). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η ενεργότητα του μεταλλάγματος στην 4-χλωροκατεχόλη (4-CC) αυξάνεται σε σύγκριση με το φυσικό ένζυμο. Τέλος, το διπλό μετάλλαγμα G292N/Y296V έδειξε 5,3 φορές αυξημένη απομάκρυνση της 3,5-DCP σε σύγκριση με το φυσικό ένζυμο (22,1±0,9% και 4,2±0,5% αντίστοιχα) (Εικόνα 7.6B). Οι ίδιες αντιδράσεις δοκιμάστηκαν και με 2 mM αρχική συγκέντρωση CPs και οι αποδόσεις απομάκρυνσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις αυξημένες κατά 1,3-1,8 φορές.



Εικόνα 7.6 Χρωματογραφήματα HPLC της αντίδρασης (A) 3-CP (μπλε: κοντρόλ, κόκκινο: φυσικό ένζυμο *Tt*PPO, πράσινο: G292N/L306A) στο οποίο φαίνεται και η 4-χλωροκατεχόλη (4-CC) ως προϊόν και (B) 3,5-DCP (μπλε: κοντρόλ, κόκκινο: φυσικό ένζυμο *Tt*PPO, πράσινο: G292N/Y296V).

Η απομάκρυνση φαινολικών ρύπων με τη χρήση PPO βασίζεται στην οξείδωσή τους στις αντίστοιχες κατεχολικές ενώσεις και στην περαιτέρω οξείδωσή τους σε αντιδραστικές κινόνες, οι οποίες υφίστανται αυθόρμητο πολυμερισμό και καταβύθιση. Ο σκοπός της έρευνας αυτής ήταν να κατασκευαστούν μεταλλάγματα της *Tt*PPO με αυξημένη ενεργότητα σε CPs. Η λογική πίσω από την επιλογή των μεταλλάξεων βασίστηκε σε προηγούμενες έρευνες που υποδείκνυαν αμινοξέα που επηρεάζουν την εκλεκτικότητα σε υποστρώματα άλλων PPO (Eicken et al., 1999; Sendovski et al., 2011; Solem et al., 2016). Εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμη δομή κάποιας PPO σε σύμπλοκο με

κάποια CP, τα δομικά χαρακτηριστικά που καθορίζουν τη διαφορετική ενεργότητα των μεταλλαγμάτων της *Tt*PPO δεν μπορούν να περιγραφούν με λεπτομέρεια.

Το L306A φαίνεται να έχει πιο προσβάσιμη την περιοχή του CuA (Εικόνα 7.5C) σε σχέση με το φυσικό στέλεχος. Παρόλα αυτά, εμφανίζει παρόμοια ή χαμηλότερη ενεργότητα έναντι όλων των CPs. Επομένως μπορεί να υποτεθεί ότι η L306 δεν εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος παρότι είναι μεγαλύτερου μεγέθους αμινοξύ. Επιπροσθέτως, σημαντική μείωση στην οξειδωτική ικανότητα εμφανίζουν όλα τα μεταλλάγματα με το G292N απέναντι στην 3,5-DCP σε σύγκριση με το φυσικό ένζυμο. Η ασπαραγίνη σε αυτή τη θέση σε πολλές PPO φαίνεται συνδεδεμένη με τη δράση μονοφαινολάσης, συντονίζοντας ένα μόριο νερού που βοηθά στην αποπρωτονίωση των μονοφαινολικών υποστρωμάτων. Αυτή η θεωρία βέβαια έχει αμφισβητηθεί στη βιβλιογραφία (Kampatsikas et al., 2017), όπου δύο PPOs εμφάνισαν δράση μονοφαινολάσης χωρίς αυτήν την ασπαραγίνη. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν την συμμετοχή αυτού του αμινοξέος στην αναγνώριση των υποστρωμάτων, καθώς όλα τα μεταλλάγματα με το G292N εμφάνισαν διαφορετική ενεργότητα προς όλες τις CPs.

Η *Tt*PPO και τα μεταλλάγματά της μπορούσαν να μετατρέψουν τις CPs σε υψηλές συγκεντρώσεις (5 mM) που συνήθως είναι τοξικές για τους μικροοργανισμούς (El-Naas et al., 2017). Τα ποσοστά βιομετατροπής κυμάνθηκαν από 21% μέχρι 35,4% και οδήγησαν στον σχηματισμό καφέ ιζήματος. Παρόλο που το G292N/L306A φάνηκε να έχει υψηλότερη ενεργότητα στην 3-CP σε σχέση με το φυσικό ένζυμο με βάση τη φασματοφωτομετρική ανάλυση, η ανάλυση HPLC έδειξε ότι καταναλώνονται ίσες ποσότητες του ρύπου. Παρόλα αυτά, η εναπομείνασα χλωροκατεχόλη που ανιχνεύθηκε στην αντίδραση με το φυσικό ένζυμο μπορεί να σημαίνει χαμηλότερη απομάκρυνση καθώς σχηματίζεται λιγότερο ίζημα. Γενικά, η μεγαλύτερη αύξηση ενεργότητας κάποιου μεταλλάγματος σε σχέση με το φυσικό ένζυμο, ήταν του G292N/Y296V για την 3,5-DCP.

8 Συμπεράσματα και Μελλοντικές προκλήσεις

Η περιβαλλοντική ρύπανση είναι σήμερα μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις παγκοσμίως, καθώς η κοινωνία αντιμετωπίζει τις συνέπειες της έντονης βιομηχανικής ανάπτυξης. Φυσικά, οι βιομηχανίες αποτελούν την πρωταρχική κινητήρια δύναμη για την οικονομική και τεχνολογική εξέλιξη μίας κοινωνίας. Παρόλα αυτά, η απρόσκοπτη ανάπτυξη των βιομηχανικών μονάδων έχει οδηγήσει στην αύξηση της εναπόθεσης των αποβλήτων τους, τα οποία περιέχουν επικίνδυνες για το περιβάλλον ουσίες. Η ευρεία χρήση παρασιτοκτόνων στη γεωργία οδηγεί σε υψηλής ποιότητας προϊόντα, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις απώλειες με στόχο την ικανοποίηση της τεράστιας ζήτησης, λόγω του όλο αυξανόμενου πληθυσμού του πλανήτη. Από την άλλη, η υπερβολική χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων στις σύγχρονες γεωργικές πρακτικές, έχει οδηγήσει σε μόλυνση του περιβάλλοντος, με αρνητικές συνέπειες για τον άνθρωπο.

Στην κορύφωση της «περιόδου των οργανοχλωριωμένων χημικών», που διήρκησε από τα τέλη της δεκαετίας του 1940 μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1980, εκδόθηκε το βιβλίο της Rachel Carson με τίτλο Silent Spring (1960). Το βιβλίο αυτό επέστησε την παγκόσμια προσοχή στις πιθανές επιπτώσεις των ανθρωπογενών χημικών και πιο συγκεκριμένα των φυτοφαρμάκων στους πληθυσμούς των άγριων ζώων, αλλά και στην υγεία του ανθρώπου. Παρότι το κείμενο αυτό επηρέασε θεμελιωδώς τις δημόσιες και πολιτικές απόψεις σχετικά με την υπερβολική χρήση χημικών, ο πλανήτης μας είναι μέχρι σήμερα μολυσμένος από τους ρύπους της εποχής εκείνης, σε συνδυασμό με τη σύγχρονη μόλυνση. Η καθημερινή παραγωγή, χρήση, εκπομπή και εναπόθεση περίπου 100.000 χημικών ενώσεων έχει άμεσες επιπτώσεις στο περιβάλλον και στους ζώντες μικροοργανισμούς. Κάποιοι από τους σύγχρονους ρύπους είναι οι έμμονοι οργανικοί ρύποι (POPs), φυτοφάρμακα, βαρέα μέταλλα, μικροπλαστικά, φαρμακευτικές και καλλυντικές ουσίες, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και ραδιενεργά ισότοπα.

Μελλοντικές Προκλήσεις

Σε παγκόσμιο επίπεδο, έχουν υπογραφεί πολλές συμφωνίες και πρωτόκολλα μεταξύ χωρών για τη μείωση της μόλυνσης, την προστασία του περιβάλλοντος, αλλά και την αποκατάστασή του. Οι διεργασίες αποκατάστασης του μολυσμένου περιβάλλοντος στην πρότερή του κατάσταση είναι γνωστές ως εξυγίανση. Κατά καιρούς, έχουν προταθεί διάφορες φυσικοχημικές μέθοδοι εξυγίανσης των μολυσμένων περιοχών, οι οποίες όμως δεν έχουν λάβει ευρεία αποδοχή. Ο κύριος λόγος, εκτός του υψηλού κόστους, είναι η δημιουργία δευτερογενών αποβλήτων της διεργασίας αυτής, τα οποία χρήζουν απόθεσης. Η βιοεξυγίανση έχει προταθεί ως μία βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική εναλλακτική, η οποία χαίρει κοινωνικής αποδοχής.

Ένας γενικός ορισμός για τη βιοεξυγίανση είναι η χρήση οργανισμών ή των προϊόντων τους (πχ ένζυμα) για την απομάκρυνση ή τη μετατροπή των ρύπων σε λιγότερο επικίνδυνες ενώσεις. Μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία, ως μέσα βιοεξυγίανσης έχουν αναφερθεί πρωτίστως βακτήρια, ένζυμα και μύκητες, ενώ δευτερευόντως φύκη, φυτά και πρωτόζωα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο γηγενής μικροβιακός πληθυσμός μιας μολυσμένης περιοχής δεν έχει τη δυνατότητα να ανταπεξέλθει στη βιομετατροπή των ρυπογόνων ενώσεων. Αυτό οφείλεται είτε στην υψηλή τοξικότητα του ρύπου και του συνεπακόλουθου χαμηλού ρυθμού μεταβολισμού των μικροβίων, είτε επειδή οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν διαθέτουν τους γενετικούς μηχανισμούς μετατροπής των ρύπων. Στην πρώτη περίπτωση, η στρατηγική που προτείνεται είναι αυτή της βιοδιέγερσης (biostimulation), δηλαδή της προσθήκης ουσιών που προάγουν την ανάπτυξη, όπως θρεπτικά συστατικά και επιφανειοδραστικές ουσίες που βοηθούν τη βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου. Στη δεύτερη περίπτωση, εφαρμόζεται η τεχνική της βιοενίσχυσης (bioaugmentation), δηλαδή ο εμβολιασμός της ρυπασμένης περιοχής με μικροοργανισμούς που είναι γνωστό ότι έχουν τη δυνατότητα να μετατρέψουν το ρύπο-στόχο και οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί προηγουμένως αλλού.

Μέχρι σήμερα, οι εργασίες σχετικά με τη βιοεξυγίανση εστιάζουν κυρίως στα συστατικά του πετρελαίου, τα βαρέα μέταλλα, οργανικά απόβλητα και πολυμερή. Οι ρυπογόνες ενώσεις στις οποίες εστίασε κυρίως η παρούσα εργασία ήταν δύο χλωριωμένοι αρωματικοί ρύποι, η 2,4-διχλωροφαινόλη (2,4-DCP) και το 2,4,5-

τριχλωροδιφαινύλιο (PCB29). Οι χλωροφαινόλες είναι από τις πιο διαδεδομένες χλωριωμένες ενώσεις στο περιβάλλον, καθώς παράγονται από τη χλωρίωση του νερού, αλλά και βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα απόβλητα βιομηχανιών κυρίως χάρτου και κλωστοϋφαντουργίας. Πιο συγκεκριμένα, η 2,4-DCP, εκτός από την ακούσια παραγωγή της, χρησιμοποιείται ως συστατικό αντισηπτικών αλλά και φυτοφαρμάκων. Επίσης, μπορεί να παραχθεί ως μεταβολίτης ενός από τα παλιότερα και ευρέως χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα, του 2,4-διχλωροφαινόξυ-οξικού οξέος. Από την άλλη, τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) ανήκουν στην κατηγορία των έμμονων οργανικών ρύπων, η οποία έχει θεσπιστεί από το Περιβαλλοντικό Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών (UNEP) για ιδιαιτέρως επικίνδυνες ενώσεις. Παρότι η παραγωγή των PCBs έχει απαγορευτεί εδώ και δεκαετίες, οι ενώσεις αυτές μπορούν να εντοπιστούν παντού στον πλανήτη, από την Αρκτική έως την Ανταρκτική και φυσικά και στον άνθρωπο.

Η παρούσα διατριβή εστίασε στην ανακάλυψη μυκητιακών στελεχών ή ενζύμων τους για χρήση στη βιοεξυγίανση των χλωριωμένων αυτών ρύπων. Οι μύκητες εμφανίζουν κατά κανόνα αντοχή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών σε σύγκριση με τα βακτήρια. Επίσης, διαθέτουν εκτεταμένο σύστημα εξωκυτταρικών ενζύμων τα οποία χρησιμοποιούν για τη βιομετατροπή ξενοβιοτικών. Οι θαλάσσια προερχόμενοι μύκητες που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία παρουσιάζουν άλλο ένα σημαντικό πλεονέκτημα, την προσαρμοστικότητά τους σε ακραίες συνθήκες, όπως είναι η έλλειψη θρεπτικών, η υψηλή αλατότητα και οι μεταβολές στο pH, χαρακτηριστικά που δε διαθέτουν τα αντίστοιχα χερσαία στελέχη. Τα συγκεκριμένα μυκητιακά στελέχη απομονώθηκαν από θαλάσσια ασπόνδυλα, όπως σπόγγους, μαλακά κοράλλια, ανεμώνες και εχινόδερμα, από διαφορετικές περιοχές του κόσμου (ανατολική και δυτική Μεσόγειος Θάλασσα, Ερυθρά Θάλασσα και Θάλασσα Ανταμάν) και διαφορετικά βάθη (10-15 m ή κυρίως 30-152 m). Η βιοποικιλότητα των συγκεκριμένων οικοσυστημάτων είναι ελάχιστα μελετημένη. Τα μυκητιακά στελέχη που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν και μελετήθηκε η δυνατότητά τους να μετατρέπουν τους ρύπους-στόχους.

Από τα 104 στελέχη που μελετήθηκαν τα 79 που ταυτοποιήθηκαν εμφάνισαν αξιόλογες τιμές απομάκρυνσης της 2,4-DCP. Μάλιστα, 9 από αυτά είχαν τη δυνατότητα μετατροπής πάνω από 55% της αρχικής συγκέντρωσης 2,4-DCP, η οποία είναι από τις υψηλότερες που έχει χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία (163 mg L^{-1}). Τα στελέχη αυτά ανήκαν στα γένη *Penicillium, Aspergillus, Chrysosporium, Cladosporium* και *Tritirachium*. Στους 9 αυτούς μικροοργανισμούς με υψηλή δυνατότητα μετατροπής της 2,4-DCP, πραγματοποιήθηκε η προσπάθεια αποκάλυψης των μεταβολικών μονοπατιών που ακολουθούνται μέσω της ταυτοποίησης των μεταβολιτών τους και της μέτρησης ενζυμικών ενεργοτήτων. Όλα τα μελετούμενα στελέχη μετέτρεπαν τη 2,4-DCP σε λιγότερο τοξικά και περισσότερο υδροφιλικά προϊόντα. Επιπλέον, κάποιοι μύκητες μπόρεσαν να αποχλωριώσουν τον ρύπο μερικώς ή πλήρως. Μερικοί από τους μεταβολίτες που εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία, όπως είναι τα συζεύγματα της 2,4-DCP με γλουταμίνη και κυστεΐνη, καθώς επίσης και ο παλμιτικός εστέρας της διχλωροκατεχόλης και η θειωμένη χλωροφαινόλη, δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα συγκεκριμένα μυκητιακά στελέχη χρησιμοποιούν μη ειδικούς μηχανισμούς για το μεταβολισμό των ξενοβιωτικών ή ότι οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες μπόρεσαν να εντοπιστούν καθώς χρησιμοποιήθηκαν σύγχρονα αναλυτικά όργανα υψηλής τεχνολογίας και αναλυτικής δύναμης.

Το στέλεχος *Tritirachium* sp. έδειξε ικανότητα της πλήρους αποχλωρίωσης της 2,4-DCP παράγοντας υδροξυκινόλη (1,2,4-τριυδροξυ-βενζόλιο) και τη συνεπακόλουθη διάνοιξη του δακτυλίου αυτού παράγοντας υδροξυ-μουκονικό οξύ. Το στέλεχος αυτό ήταν και το μόνο που έδειξε υψηλή ενεργότητα 1,2-διοξυγενάσης της κατεχόλης (C12O). Το γεγονός αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό, καθώς η διάνοιξη του βενζολικού δακτυλίου συνεπάγεται πλήρη απώλεια της τοξικότητας του ρύπου και πιθανή αφομοίωσή του από τα κύτταρα για παραγωγή ενέργειας. Ένα άλλο σημαντικό συμπέρασμα που εξάγεται από τα παραπάνω είναι ότι ο συγκεκριμένος μύκητας πραγματοποιεί τη διάνοιξη του δακτυλίου ύστερα από την αποχλωρίωσή του. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις μέχρι τώρα γνώσεις σχετικά με την αφομοίωση του 2,4-DCP, οι οποίες περιορίζονταν σε βακτήρια και σύμφωνα με τις οποίες πρώτα πραγματοποιείται

διάνοιξη του δακτυλίου και αυθόρμητη απομάκρυνση του ενός χλωρίου και στη συνέχεια η πλήρης αποχλωρίωση του αλειφατικού προϊόντος με αφαλογονάσες των αλκανίων.

Η υψηλή ενεργότητα C12O που παρουσίασε το στέλεχος *Tritirachium* κατά την αποικοδόμηση της 2,4-DCP, μας ώθησε στην απομόνωση και μελέτη του υπεύθυνου ενζύμου. Ένζυμα με ενεργότητα C12O έχουν απομονωθεί κυρίως από βακτήρια και από δύο στελέχη *Candida* (ασκομύκητας). Είναι η πρώτη φορά που επιχειρείται απομόνωση τέτοιας ενεργότητας από βασιδιομύκητα όπως ο *Tritirachium*. Η απομόνωση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στήλης ιοντοεναλλαγής σε ένα μόνο βήμα και με υψηλή ανάκτηση ενεργότητας. Με βάση την ηλεκτροφόρηση πολυακριλαμιδίου, η απομονωμένη πρωτεΐνη φάνηκε να έχει πολύ υψηλότερο μοριακό βάρος (~77 kDa) από ότι οι υπόλοιπες χαρακτηρισμένες ως τώρα. Η πρωτεομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε δεν κατάφερε να δώσει αποτέλεσμα για την ακριβή αλληλουχία της πρωτεΐνης, πράγμα που σημαίνει ότι καμία γνωστή αλληλουχία στις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων δεν έχει υψηλή ομολογία με αυτή που απομονώθηκε. Παρόλα αυτά, φάνηκε ότι υπάρχει χαμηλή επικάλυψη (7-8%) με μυκητιακές καταλάσες.

Η ενεργότητα καταλάσης του απομονωμένου ενζύμου επιβεβαιώθηκε και πειραματικά και φάνηκε να είναι πολλές φορές υψηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη ενεργότητα C12O. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η διλειτουργικότητα των καταλασών δεν είναι κάτι αξιοσημείωτο, καθώς πολλές εμφανίζουν επιπλέον ενεργότητα κατεχολοξειδάσης και άλλες ενεργότητα υπεροξειδάσης. Παρόλα αυτά, οι γνωστές καταλάσες δεν εμφανίζουν ενεργότητα διοξυγενάσης, με μόνο μία εξαίρεση. Η καταλάση από τον *Bacillus stearothermophilus* εμφάνισε ενεργότητα 2,3-διοξυγενάσης της τρυπτοφάνης μόνο παρουσία αναγωγικού παράγοντα. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι 2,3-διοξυγενάσες της τρυπτοφάνης είναι από τις ελάχιστες περιπτώσεις διοξυγενασών που πραγματοποιούν την κατάλυση με αίμη, όπως συμβαίνει και στις καταλάσες. Αντιθέτως, οι C12O έχουν απλό ιόν σιδήρου στο ενεργό τους κέντρο. Μελέτες με χρήση παρεμποδιστών έδειξαν ότι είναι πιθανό οι δύο δράσεις να μην πραγματοποιούνται στο ίδιο σημείο της πρωτεΐνης. Είναι πολύ σημαντικό να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες

σχετικά με την καινοτόμα αυτή διττή δράση του ενζύμου. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, θα πρέπει αρχικά να εντοπιστεί το γονίδιο και να εκφραστεί ετερόλογα ώστε να παραχθεί σε υψηλές ποσότητες, με σκοπό να πραγματοποιηθούν κρυσταλλογραφικές μελέτες με παρεμποδιστές και υποστρώματα, ώστε να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός της κάθε δράσης.

Παράλληλα, το απομονωμένο ένζυμο χαρακτηρίστηκε με την ιδιότητά του ως C12O και βρέθηκε η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του, καθώς μελετήθηκε και η θερμοσταθερότητά του. Το ένζυμο έδειξε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (45-60 °C) στο οποίο μπορεί να λειτουργεί με υψηλή ταχύτητα για τη διάσπαση του κατεχολικού δακτυλίου. Επίσης εμφάνιζε αξιοσημείωτη θερμοσταθερότητα ειδικά σε σύγκριση με τις υπόλοιπες χαρακτηρισμένες C12O. Ένα άλλο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό ήταν η ελάχιστη επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (0,25-1 M NaCl και $MgCl_2$) στη δράση του. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι πιθανότητα απόρροια της αντοχής που δείχνει και ο μικροοργανισμός από τον οποίο προέρχεται το ένζυμο αυτό, καθώς ζει στη θάλασσα. Ένα ακόμα ενδιαφέρον γνώρισμα του ενζύμου αυτού είναι ότι εκτός από τη διάσπαση της κατεχόλης και της υδροκινόλης, μπορεί να πραγματοποιεί και της 4-χλωροκατεχόλης. Αυτό το γεγονός κάνει το ένζυμο ακόμα πιο ελκυστικό για τη χρήση σε εφαρμογές βιοεξυγίανσης. Για παράδειγμα, η χρήση του ενζύμου θα μπορούσε να δοκιμαστεί στην κλωστοϋφαντουργία αλλά και στη βιομηχανία χάρτου, καθώς υπάρχει ανάγκη απομάκρυνσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου που χρησιμοποιείται για τη λεύκανση. Παράλληλα, εκμεταλλευόμενοι τη διπλή δράση του ενζύμου, θα μπορούσε να πραγματοποιείται και ταυτόχρονη απομάκρυνση των φαινολικών και χλωροφαινολικών παραγώγων που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα των βιομηχανιών αυτών.

Στη συνέχεια της διατριβής, οι ίδιοι θαλάσσιοι μύκητες που δοκιμάστηκαν για την απομάκρυνση της 2,4-DCP, δοκιμάστηκαν και για το PCB29. Το PCB29 συγκριτικά, είναι ένα πολύ πιο τοξικό και πολύπλοκο μόριο, καθώς αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους και φέρει τρεις υποκαταστάτες χλωρίου. Η συγκέντρωση στην οποία μελετήθηκε η απομάκρυνση του PCB29 είναι η συγκέντρωση κορεσμού του ρύπου στο νερό, δηλαδή η συγκέντρωση στην οποία

θα ερχόταν σε επαφή ένας μικροοργανισμός με το ρύπο στο φυσικό περιβάλλον. Από τα 104 στελέχη που μελετήθηκαν, τα 72 που ταυτοποιήθηκαν εμφάνισαν αξιόλογες τιμές απομάκρυνσης του PCB29. Οκτώ από τα στελέχη αυτά κατάφεραν να απομακρύνουν το ρύπο σχεδόν εξολοκλήρου (>98.5%) και ανήκαν στα γένη *Penicillium*, *Aspergillus*, *Purpureocillium*, *Cladosporium* και *Alternaria*. Για τα στελέχη αυτά, επιχειρήθηκε η ταυτοποίηση των μεταβολιτών τους, η οποία όμως δεν κατέστη δυνατή. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην πολύ χαμηλή συγκέντρωση των μεταβολιτών, η οποία είναι χαμηλότερη από τα όρια ανίχνευσης του οργάνου. Στην προσπάθεια να γίνει μια υπόθεση του μηχανισμού απομάκρυνσης του PCB29 από τα μυκητιακά στελέχη, μετρήθηκαν ενζυμικές ενεργότητες διοξυγενασών του 2,3-διυδροξυ-διφαινυλίου, διοξυγενασών της κατεχόλης, αφαλογωνάσης των αλκανίων, υπεροξειδάσης και λακκάσης. Από αυτές τις ενεργότητες, μετρήσιμες τιμές είχαν μόνο οι ενεργότητες υπεροξειδάσης και λακκάσης, ειδικά για το ένα στέλεχος *Cladosporium*. Αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι κάποιοι από τους μύκητες χρησιμοποιούν τα εξωκυτταρικά οξειδωτικά ένζυμα της οικογένειας των λιγνινασών για την απομάκρυνση του ρύπου, μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών που οδηγούν στον διμερισμό/πολυμερισμό και καταβύθισή του.

Το στέλεχος με τη δυνατότητα έκφρασης της υψηλότερης ενεργότητας λακκάσης μελετήθηκε περαιτέρω, με σκοπό την ακόμα υψηλότερη έκφραση της ενεργότητας αυτής και τελικά την απομόνωση ενζύμου. Για αυτό το λόγο, μελετήθηκαν διαφορετικές ουσίες ως επαγωγείς της έκφρασης, εκτός από τον ρύπο. Τα καλύτερα αποτελέσματα έδειξε η προσθήκη ιόντων χαλκού στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Ύστερα από βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ιόντων χαλκού, το στέλεχος *Cladosporium* καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου 12 L και πραγματοποιήθηκε η παραγωγή λακκασών σε μεγαλύτερη κλίμακα. Από το εξωκυτταρικό της καλλιέργειας απομονώθηκαν δύο ισοένζυμα με ενεργότητα λακκάσης και πραγματοποιήθηκε ο βιοχημικός τους χαρακτηρισμός. Τα χαρακτηριστικά τους ήταν παρόμοια με άλλες χαρακτηρισμένες λακκάσες, ενώ ενδιαφέρον παρουσίασε το ένα από τα δύο ισοένζυμα λόγω της απομάκρυνσης του PCB29 με την προσθήκη μεσολαβητή, σε ποσοστό περίπου 71% ύστερα από 20 h. Το δεδομένο αυτό αποτελεί απόδειξη ότι

η απομονωμένη λακκάση είναι στην πραγματικότητα ένα από τα ένζυμα που χρησιμοποιεί ο μύκητας για την απομάκρυνση του ρύπου. Επίσης, το γεγονός αυτό κάνει πολύ ελκυστική τη χρήση της λακκάσης αυτής για την αποτοξικοποίηση και άλλων χλωριωμένων αρωματικών ρύπων. Ένα σημαντικό πρόβλημα με τη μελέτη των ενζύμων αυτών ήταν τα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασής τους από το φυσικό στέλεχος. Για να γίνει εκτενέστερη μελέτη τους, αλλά και για να μπορούν να εφαρμοστούν σε μεγάλη κλίμακα, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί η ετερόλογη έκφρασή τους σε ένα ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης.

Όπως και στην περίπτωση της καινοτόμου καταλάσης παραπάνω, έτσι και στην περίπτωση των λακκασών πρέπει να γίνει πρώτα γνωστή η αμινοξική αλληλουχία των πρωτεϊνών αυτών. Εφόσον η ομολογία των ενζύμων αυτών με άλλα γνωστά είναι πολύ μικρή, αυτό το εγχείρημα γίνεται πολύ δύσκολο με τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές πρωτεομικής. Έτσι, έχουν πραγματοποιηθεί γενομικές και μεταγραφομικές αναλύσεις για τα δύο μυκητιακά στελέχη (*Tritirachium* sp. και *Cladosporium* sp.) από τα οποία προέρχονται τα αντίστοιχα απομονωμένα ένζυμα. Κατά την περίοδο συγγραφής της διατριβής πραγματοποιείται η βιοπληροφορική ανάλυση των αναλύσεων αυτών. Σκοπός είναι, με τα μεταγραφομικά δεδομένα σε συνδυασμό με τα γενομικα, να αποκαλυφθούν οι μηχανισμοί αποικοδόμησης του κάθε ρύπου από το αντίστοιχο στέλεχος. Παράλληλα, θα γίνουν γνωστά τα γονίδια που εμπλέκονται, όπως η καταλάση και οι λακκάσες και έτσι θα υπάρχει πληροφορία για τα ένζυμα αυτά σε επίπεδο DNA και RNA. Αυτή η πληροφορία θα επιτρέψει την κλωνοποίηση και την έκφραση των ενζύμων αυτών σε μεγαλύτερες ποσότητες για τη ενδεχόμενη βιομηχανική αξιοποίησή τους.

Στο πρώτο τμήμα της διατριβής, πραγματοποιήθηκε η ανακάλυψη τριών ενζύμων με μεθόδους που βασίζονται στη μέτρηση ενεργότητας και σε παραδοσιακές τεχνικές χρωματογραφίας για την απομόνωση πρωτεϊνών. Η χρήση των τεχνικών αυτών μας επέτρεψε να ανακαλύψουμε ένα πολύ καινοτόμο ένζυμο, το οποίο διαφορετικά θα αγνοούταν. Στη συνέχεια της διατριβής πραγματοποιήθηκε η ανακάλυψη ενός άλλου ενζύμου, μιας πολυφαινολοξειδάσης

(PPO), με τη χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων. Σκοπός ήταν η ανακάλυψη μιας οξειδάσης η οποία θα είχε δράση σε χλωριωμένες φαινόλες για χρήση στη βιοεξυγίανση. Η βιοπληροφορική ανάλυση οδήγησε σε μια αλληλουχία του γονιδιώματος του μύκητα *Thrmothelomyces thermophila*, η οποία ανήκε στην οικογένεια των τυροσινασών και η οποία είχε χαμηλή ομολογία με άλλες γνωστές. Το αντίστοιχο γονίδιο κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε στη ζύμη *Pichia pastoris*. Ύστερα από την απομόνωσή του, ακολούθησε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του. Το ένζυμο φάνηκε να έχει κάποια ξεχωριστά χαρακτηριστικά σε σχέση με άλλα ομόλογα, όπως ήταν η υψηλή θερμοκρασία (65 °C) και το αλκαλικό pH (7,5-8) βέλτιστης δράσης του αλλά και η υψηλή θερμοσταθερότητά του. Η PPO αυτή, παρότι δεν είχε τη δυνατότητα οξείδωσης της τυροσίνης, μπορούσε να οξειδώσει με υψηλούς ρυθμούς ένα μεγάλο εύρος κατεχολικών, πολυφαινολικών, αλλά και φαινολικών ενώσεων. Μεταξύ αυτών ήταν η 4-χλωροκατεχόλη και η 3,5-διχλωροκατεχόλη.

Η ανασυνδυασμένη PPO έδειξε επίσης καταλυτική ενεργότητα σε ένα εύρος χλωροφαινολών και διχλωροφαινολών που δοκιμάστηκαν. Με σκοπό την αύξηση της ενεργότητας αυτής στις χλωροφαινόλες, αλλά παράλληλα και τη μελέτη της επίδρασης των αμινοξικών καταλοίπων στην ενεργότητα και στερεοεκλεκτικότητα των PPO, πραγματοποιήθηκαν μεταλλάξεις σημείου στην αλληλουχία της PPO, με εργαλεία πρωτεϊνικής μηχανικής. Τα σημεία της αμινοξικής αλληλουχίας που επιλέχθηκαν για μετάλλαξη εντοπίστηκαν στην ευρύτερη περιοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου, όπου σε προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι μπορεί να έχουν επίδραση στην εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα. Έτσι, κατασκευάστηκαν 5 τροποποιημένα ένζυμα με μονές και διπλές μεταλλάξεις και δοκιμάστηκαν στην οξείδωση των χλωροφαινολών. Σε κάποια παρατηρήθηκαν αλλαγές στην εξειδίκευση αλλά και στην στερεοεκλεκτικότητα. Το τροποποιημένο ένζυμο που παρουσίασε τη μεγαλύτερη αύξηση σε κάποια χλωροφαινόλη, σε σχέση με το φυσικό ένζυμο, ήταν αυτό που έφερε τις μεταλλάξεις G292N/Y296V. Το ένζυμο αυτό παρουσίασε αυξημένη ενεργότητα στην 3,5-DCP κατά 5,3 φορές. Είναι αξιοσημείωτο ότι μόνο με δύο σωστά επιλεγμένες μεταλλάξεις μεταβλήθηκε σημαντικά η εκλεκτικότητα του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα.

Μελλοντικές Προκλήσεις

Σε συνέχεια της μελέτης τις επίδρασης των μεταλλάξεων στη δράση της PPO πραγματοποιήθηκαν μελέτες κρυστάλλωσης του ενζύμου με σκοπό την εύρεση της τριτοταγούς δομής του. Κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διατριβής πραγματοποιήθηκε η επίλυση της δομής και πειράματα πρόσδεσης υποστρωμάτων στους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους. Με τον τρόπο αυτό, θα γίνει πλήρης αποσαφήνιση των αμινοξικών καταλοίπων του ενζύμου που αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματα, με τελικό στόχο την αποσαφήνιση της συσχέτισης δομής και λειτουργίας ενζύμων με σπουδαίο βιομηχανικό ενδιαφέρον στον τομέα της βιοεξυγίανσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Afreen, S., Shamsi, T.N., Baig, M.A., Ahmad, N., Fatima, S., Qureshi, M.I., Hassan, M.I., Fatma, T., 2017. A novel multicopper oxidase (laccase) from cyanobacteria: Purification, characterization with potential in the decolorization of anthraquinonic dye. PLoS One 12, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0175144

Agarwal, P., Saroj, S., Bubey, S., Singh, R.P., 2014. L-Tyrosinase - A multifunctional enzyme: Structural and molecular features, in: Biotechnology Volume 5: Gene and Protein Egineering. Studium Press LLC, pp. 425–445.

Anku, W.W., Mamo, M.A., Govender, P.P., 2017. Phenolic compounds in water: Sources, reactivity, toxicity and treatment methods, in: Marcos Soto-Hernandez, Mariana Palma-Tenango, Maria del Rosario Garcia-Mateos (Eds.), Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications. InTech, pp. 419–443. doi:10.5772/66927

Aranda, E., 2016. Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with *Ascomycota* fungi. Curr. Opin. Biotechnol. 38, 1–8. doi:10.1016/J.COPBIO.2015.12.002

Arora, P., Bae, H., 2014. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. Microb. Cell Fact. 13, 31. doi:10.1186/1475-2859-13-31

Arora, P.K., Srivastava, A., Singh, V.P., 2010. Application of monooxygenases in dehalogenation, desulphurization, denitrification and hydroxylation of aromatic compounds. J. Bioremediation Biodegrad. 01, 1–8. doi:10.4172/2155-6199.1000112

Arrebola, J.P., Fernández, M.F., Martin-Olmedo, P., Bonde, J.P., Martín-Rodriguez, J.L., Expósito, J., Rubio-Domínguez, A., Olea, N., 2015. Historical exposure to persistent organic pollutants and risk of incident hypertension. Environ. Res. 138, 217–23. doi:10.1016/j.envres.2015.02.018

Atalla, S., Kheiralla, Z., Hamed, E., Youssry Amani, A., Abd El Aty, A., 2013. Characterization and kinetic properties of the purified Trematosphaeria mangrovei laccase enzyme. Saudi J. Biol. Sci. 20, 373–381. doi:10.1016/j.sjbs.2013.04.001

Atashgahi, S., Häggblom, M.M., Smidt, H., 2018. Organohalide respiration in pristine

environments: implications for the natural halogen cycle. Environ. Microbiol. 20, 934–948. doi:10.1111/1462-2920.14016

Ba, S., Vinoth Kumar, V., 2017. Recent developments in the use of tyrosinase and laccase in environmental applications. Crit. Rev. Biotechnol. 37, 819–832. doi:10.1080/07388551.2016.1261081

Baldrian, P., 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. FEMS Microbiol. Rev. 30, 215–242. doi:10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x

Barone, R., De Santi, C., Palma Esposito, F., Tedesco, P., Galati, F., Visone, M., Di Scala, A., De Pascale, D., 2014. Marine metagenomics, a valuable tool for enzymes and bioactive compounds discovery. Front. Mar. Sci. 1. doi:10.3389/fmars.2014.00038

Barrios-Estrada, C., Rostro-Alanis, M.D.J., Muñoz-gutiérrez, B.D., Iqbal, H.M.N., Kannan, S., Parra-saldívar, R., 2018. Emergent contaminants : Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. Sci. Total Environ. 612, 1516–1531. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.013

Batista-garcía, A., Vinoth, V., Ariste, A., Tovar-herrera, O.E., Savary, O., Peidro-guzm, H., Jackson, S.A., Dobson, A.D.W., Gonz, D., Folch-mallol, J.L., Leduc, R., Rayo, S., Cabana, H., 2017. Simple screening protocol for identi fi cation of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial ef fl uents 198. doi:10.1016/j.jenvman.2017.05.010

Berghuis, S.A., Bos, A.F., Sauer, P.J.J., Roze, E., 2015. Developmental neurotoxicity of persistent organic pollutants: an update on childhood outcome. Arch. Toxicol. 89, 687–709. doi:10.1007/s00204-015-1463-3

Berka, R.M., Grigoriev, I. V, Otillar, R., Salamov, A., Grimwood, J., Reid, I., Ishmael, N., John, T., Darmond, C., Moisan, M.-C., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Lombard, V., Natvig, D.O., Lindquist, E., Schmutz, J., Lucas, S., Harris, P., Powlowski, J., Bellemare, A., Taylor, D., Butler, G., de Vries, R.P., Allijn, I.E., van den Brink, J., Ushinsky, S., Storms, R., Powell, A.J., Paulsen, I.T., Elbourne, L.D.H., Baker, S.E., Magnuson, J., LaBoissiere, S., Clutterbuck, A.J.,

Martinez, D., Wogulis, M., de Leon, A.L., Rey, M.W., Tsang, A., 2011. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. Nat. Biotechnol. 29, 922–927. doi:10.1038/nbt.1976

Bertrand, B., Martinez-Morales, F., Trejo-Hernandez, M.R., 2013. Fungal Laccases: Induction and Production. Rev. Mex. Ing. Química 12, 473–488. doi:10.41718/ACP.2013.16.2.6

Birolli, W.G., de A. Santos, D., Alvarenga, N., Garcia, A.C.F.S., Romão, L.P.C., Porto, A.L.M., 2018. Biodegradation of anthracene and several PAHs by the marine-derived fungus *Cladosporium* sp. CBMAI 1237. Mar. Pollut. Bull. 129, 525–533. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2017.10.023

Blaich, R., Esser, K., 1975. Function of Enzymes in Wood Destroying Fungi II . Multiple Forms of Laccase in White Rot Fungi 277, 271–277.

Boada, L.D., Zumbado, M., Henríquez-Hernández, L., Almeida-González, M., Álvarez-León, E.E., Serra-Majem, L., Luzardo, O.P., 2012. Complex organochlorine pesticide mixtures as determinant factor for breast cancer risk: a population-based case–control study in the Canary Islands (Spain). Environ. Heal. 11, 28. doi:10.1186/1476-069X-11-28

Bonugli-santos, R.C., Durrant, L.R., Sette, L.D., 2010. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. Fungal Biol. 114, 863–872. doi:10.1016/j.funbio.2010.08.003

Borja, J., Marie Taleon, D., Auresenia, J., Gallardo, S., 2005. Polychlorinated Biphenyls and Their Biodegradation. Process Biochem. 40, 1999–2013. doi:10.1016/j.procbio.2004.08.006

Bovio, E., Gnavi, G., Prigione, V., Spina, F., Denaro, R., Yakimov, M., Calogero, R., Crisafi, F., Varese, G.C., 2017. The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation. Sci. Total Environ. 576, 310–318. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.064

Briganti, F., Pessione, E., Giunta, C., Scozzafava, A., 1997. Purification, biochemical

properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. FEBS Lett. 416, 61–64. doi:10.1016/S0014-5793(97)01167-8

Bugg, T.D.H., 2011. Non-heme iron-dependent dioxygenases: Mechanism and structure, in: Iron-Containing Enzymes. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 42–66. doi:10.1039/9781849732987-00042

Buitrago, E., Hardré, R., Haudecoeur, R., Jamet, H., Belle, C., Boumendjel, A., Bubacco, L., Réglier, M., 2016. Are human tyrosinase and related proteins suitable targets for melanoma therapy? Curr. Top. Med. Chem. 16, 3033–3047.

Bukowska, B., Michałowicz, J., Krokosz, A., Sicińska, P., 2007. Comparison of the effect of phenol and its derivatives on protein and free radical formation in human erythrocytes (in vitro). Blood Cells, Mol. Dis. 39, 238–244. doi:10.1016/J.BCMD.2007.06.003

Cabrera-Valladares, N., Martinez, A., Pinero, S., Lagunas-Munoz, V.H., Tinoco, R., de Anda, R., Vazquez-Duhalt, R., Bolivar, F., Gosset, G., 2006. Expression of the melA gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. Enzyme Microb. Technol. 38, 772–779. doi:10.1016/J.ENZMICTEC.2005.08.004

Caglio, R., Valetti, F., Caposio, P., Gribaudo, G., Pessione, E., Giunta, C., 2009. Fine-Tuning of Catalytic Properties of Catechol 1 , 2- Dioxygenase by Active Site Tailoring 1015–1024. doi:10.1002/cbic.200800836

Cai, W., Li, J., Zhang, Z., 2007. The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. J. Hazard. Mater. 148, 38–42. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2007.02.002

Catalan, J., 2015. Tracking long-range atmospheric transport of trace metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, and organohalogen compounds using lake sediments of mountain regions, in: Blais, J.M., Rosen, M.R., Smol, J.P. (Eds.), Environmental Contaminants, Developments in Paleoenvironmental Research. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 263–322. doi:10.1007/978-94-017-9541-8

Cavallazzi, J.R.P., Kasuya, C.M., Soares, M.A., 2005. SCREENING OF INDUCERS

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

Chakroun, H., Mechichi, T., Jesus, M., Dhouib, A., Sayadi, S., 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete Trichoderma atroviride : Application on bioremediation of phenolic compounds. Process Biochem. 45, 507–513. doi:10.1016/j.procbio.2009.11.009

Chang, Y.-C., Takada, K., Choi, D., Toyama, T., Sawada, K., Kikuchi, S., 2013. Isolation of biphenyl and polychlorinated biphenyl-degrading bacteria and their degradation pathway. Appl. Biochem. Biotechnol. 170, 381–398. doi:10.1007/s12010-013-0191-5

Chaurasia, P.K., Shanker, R., Yadav, S., Yadava, S., 2013. A review on mechanism of laccase action. Trade Sci. Inc 7, 66–71.

Chen, A., Zeng, G., Chen, G., Fan, J., Zou, Z., Li, H., Hu, X., Long, F., 2011. Simultaneous cadmium removal and 2,4-dichlorophenol degradation from aqueous solutions by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91, 811–821. doi:10.1007/s00253-011-3313-4

Chen, G.-H., Chen, W.-M., Huang, Y.-C., Jiang, S.-T., 2012. Expression of recombinant mature human tyrosinase from *Escherichia coli* and exhibition of its activity without phosphorylation or glycosylation. J. Agric. Food Chem. 60, 2838–2843. doi:10.1021/jf205021g

Chen, H.-Y., Xue, D., Feng, X.-Y., Yao, S.-J., 2011. Screening and Production of Ligninolytic Enzyme by a Marine-Derived Fungal Pestalotiopsis sp. J63. Appl. Biochem. Biotechnol. 165, 1754–1769. doi:10.1007/s12010-011-9392-y

Chen, K., Arnold, F.H., 1993. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 5618–22. doi:10.1073/pnas.90.12.5618

Chen, M.-L., Wang, L., Chi, Y.K., Mao, C.-C., Lung, S.-C.C., Mao, I.-F., 2012. Polybrominated diphenyl ethers in foodstuffs from Taiwan: level and human dietary exposure assessment. Sci. Total Environ. 431, 183–7.

doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.046

Chen, Y., Wang, X., Li, Y., Toms, L.-M.L., Gallen, M., Hearn, L., Aylward, L.L., McLachlan, M.S., Sly, P.D., Mueller, J.F., 2015. Persistent organic pollutants in matched breast milk and infant faeces samples. Chemosphere 118, 309–14. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.09.076

Chmelova, D., Ondrejovic, M., 2016. Purification and characterization of extracellular laccase produced by Ceriporiopsis subvermispora and decolorization of triphenylmethane dyes. J. Basic Microbiol. 1173–1182. doi:10.1002/jobm.201600152

Choi, J.-M., Han, S.-S., Kim, H.-S., 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. Biotechnol. Adv. 33, 1443–1454. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2015.02.014

Claus, H., 2004. Laccases: Structure, reactions, distribution. Micron 35, 93–96. doi:10.1016/j.micron.2003.10.029

Claus, H., 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. Arch. Microbiol. 179, 145–150. doi:10.1007/s00203-002-0510-7

Constabel, C.P., Barbehenn, R., 2008. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants, in: Induced Plant Resistance to Herbivory. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 253–270. doi:10.1007/978-1-4020-8182-8_12

Crinnion, W.J., 2011. Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences. Altern. Med. Rev. 16, 5–13.

Croes, K., Colles, A., Koppen, G., Govarts, E., Bruckers, L., Van de Mieroop, E., Nelen, V., Covaci, A., Dirtu, A.C., Thomsen, C., Haug, L.S., Becher, G., Mampaey, M., Schoeters, G., Van Larebeke, N., Baeyens, W., 2012. Persistent organic pollutants (POPs) in human milk: a biomonitoring study in rural areas of Flanders (Belgium). Chemosphere 89, 988–94. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.06.058

Czaplicka, M., 2004. Sources and transformations of chlorophenols in the natural

environment. Sci. Total Environ. 322, 21–39. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2003.09.015

Dangi, A.K., Sharma, B., Hill, R.T., Shukla, P., 2019. Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach. Crit. Rev. Biotechnol. 39, 79–98. doi:10.1080/07388551.2018.1500997

Davis, R., Molloy, S., Quigley, B., Nikodinovic-Runic, J., Solano, F., O'Connor, K.E., 2018. Biocatalytic versatility of engineered and wild-type tyrosinase from *R. solanacearum* for the synthesis of 4-halocatechols. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 5121–5131. doi:10.1007/s00253-018-8994-5

Decker, H., Solem, E., Tuczek, F., 2018. Are glutamate and asparagine necessary for tyrosinase activity of type-3 copper proteins? Inorganica Chim. Acta 481, 32–37. doi:10.1016/J.ICA.2017.11.031

Deng, C., Huang, T., Jiang, Z., Lv, X., Liu, L., Chen, J., 2019. Enzyme Engineering and Industrial Bioprocess, in: Larroche, C., Sanroman, M., Du, G., Pandey, A. (Eds.), Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, pp. 165–188. doi:10.1016/B978-0-444-64085-7.00007-1

Deribe, E., Rosseland, B.O., Borgstrøm, R., Salbu, B., Gebremariam, Z., Dadebo, E., Skipperud, L., Eklo, O.M., 2014. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in fish from Lake Awassa in the Ethiopian Rift Valley: Human health risks. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 93, 238–244. doi:10.1007/s00128-014-1314-6

Desai, S.S., Nityanand, C., 2011. Microbial Laccases and their Applications: A Review. Asian J. Biotechnol. 3, 98–124.

Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., Jesus, M., Provence, U. De, Microbiologie, L., Esil, I.R.D.L., Luminy, A. De, 2005. Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. World J. Microbiol. Biotechnol. 21, 1415–1423. doi:10.1007/s11274-005-5774-z

Dionisi, H.M., Lozada, M., Olivera, N.L., 2012. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. Rev. Argent. Microbiol. 44, 49–60. doi:10.1590/S0325-75412012000100010

Dirinck, E., Jorens, P.G., Covaci, A., Geens, T., Roosens, L., Neels, H., Mertens, I., Van Gaal, L., 2010. Obesity and persistent organic pollutants: Possible obesogenic effect of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls. Obesity 19, 709–714. doi:10.1038/oby.2010.133

Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu, Y., Gorman, M.J., Kramer, K.J., Kanost, M.R., 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm , Manduca sexta , and the malaria mosquito , Anopheles gambiae. Insect Biochem. Mol. Biol. 34, 29–41. doi:10.1016/j.ibmb.2003.08.003

Do Rosario Freixo, M., Karmali, A., Arteiro, J.M., 2014. Production , purification and characterization of laccase from Pleurotus ostreatus grown on tomato pomace. World J. Microbiol. Biotechnol. 245–254. doi:10.1007/s11274-011-0813-4

Dubey, K.K., Pramanik, A., Ankush, Khushboo, Yadav, J., 2019. Enzyme Engineering, in: Singh, R., Singhania, R., Larroche, C. (Eds.), Advances in Enzyme Technology. Elsevier, pp. 325–347. doi:10.1016/B978-0-444-64114-4.00012-1

Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P., Kumar, A., 2011. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Structure – function relationship among bacterial , fungal and plant laccases. "Journal Mol. Catal. B, Enzym. 68, 117–128. doi:10.1016/j.molcatb.2010.11.002

Edalli, V.A., Mulla, S.I., Eqani, S.A.M.A.S., Mahadevan, G.D., Sharma, R., Shouche, Y., Kamanavalli, C.M., 2016. Evaluation of p-cresol degradation with polyphenol oxidase (PPO) immobilized in various matrices. 3 Biotech 6, 229. doi:10.1007/s13205-016-0547-y

Eicken, C., Krebs, B., Sacchettini, J.C., 1999. Catechol oxidase - structure and activity. Curr. Opin. Struct. Biol. 9, 677–83.

El-Naas, M.H., Mousa, H.A., Gamal, M. El, 2017. Microbial degradation of chlorophenols, in: Singh, S.N. (Ed.), Microbe-Induced Degradation of Pesticides. Springer, pp. 23–58. doi:10.1007/978-3-319-45156-5_2

El-Shora, H.M., Metwally, M., 2008. Use of tyrosinase enzyme from Bacillus

thuringiensis for the decontamination of water polluted with phenols. Biotechnology(Faisalabad) 7, 305–310. doi:10.3923/biotech.2008.305.310

Erickson, M., 2001. Introduction to PCB: Properties, Uses, Occurrence and Regulatory History, in: Robertson, L.W., Hansen, L.G. (Eds.), PCBs : Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects. The University Press of Kentucky, p. 494.

Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M., Thöny-Meyer, L., 2012. Bacterial tyrosinases and their applications. Process Biochem. 47, 1749–1760. doi:10.1016/j.procbio.2012.08.018

Fahr, K., Wetzstein, H.-G., Grey, R., Schlosser, D., 1999. Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. FEMS Microbiol. Lett. 175, 127–132. doi:10.1016/S0378-1097(99)00184-6

Ferrer, M., Ferrer, Manuel, 2018. Biocatalysis and Biotransformations. Catalysts 8, 216. doi:10.3390/catal8050216

Ferrer, M., Martínez-Martínez, M., Bargiela, R., Streit, W.R., Golyshina, O. V, Golyshin, P.N., 2015. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. Microb. Biotechnol. doi:10.1111/1751-7915.12309

Fetzner, S., 2012. Ring-cleaving dioxygenases with a cupin fold. Appl. Environ. Microbiol. 78, 2505–2514. doi:10.1128/AEM.07651-11

Final Act of the Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, 2001. , Stockholm POPs Convention.

Fujieda, N., Murata, M., Yabuta, S., Ikeda, T., Shimokawa, C., Nakamura, Y., Hata, Y., Itoh, S., 2012. Multifunctions of MelB, a fungal tyrosinase from *Aspergillus oryzae*. ChemBioChem 13, 193–201. doi:10.1002/cbic.201100609

Fusi, S.C., Chan, A.Y., Kjellerup, B. V., 2017. Processes of microbial transformation and physical removal of polychlorinated biphenyls (PCBs) in wastewater treatment, in: Purohit H., Kalia V., Vaidya A., K.A. (Ed.), Optimization and Applicability of Bioprocesses. Springer Singapore, Singapore, pp. 101–113.

doi:10.1007/978-981-10-6863-8_5

Gascon, M., Morales, E., Sunyer, J., Vrijheid, M., 2013. Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: a systematic review. Environ. Int. 52, 51–65. doi:10.1016/j.envint.2012.11.005

Gasparetti, C., Faccio, G., Arvas, M., Buchert, J., Saloheimo, M., Kruus, K., 2010. Discovery of a new tyrosinase-like enzyme family lacking a C-terminally processed domain: production and characterization of an *Aspergillus oryzae* catechol oxidase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 213–226. doi:10.1007/s00253-009-2258-3

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in: John M. Walker (Ed.), The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 571–607. doi:10.1385/1-59259-890-0:571

Gasull, M., Bosch de Basea, M., Puigdomènech, E., Pumarega, J., Porta, M., 2011. Empirical analyses of the influence of diet on human concentrations of persistent organic pollutants: a systematic review of all studies conducted in Spain. Environ. Int. 37, 1226–35. doi:10.1016/j.envint.2011.05.008

Gaviria-Arroyave, M.I., Osorio-Echavarria, J., Gomez-Vanegas, N.A., 2018. Evaluating the scale-up of a reactor for the treatment of textile effluents using Bjerkandera sp. Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia 80–90. doi:10.17533/udea.redin.n88a09

Gayazov, R., Rodakiewicz-Nowak, J., 1996. Semi-continuous Production of Laccase by Phlebia radiata in Different Culture Media. Folia Microbiol. (Praha). 41, 480–484. doi:10.1007/BF02814662

Gayosso-Canales, M., Rodríguez-Vázquez, R., Esparza-García, F.J., Bermúdez-Cruz, R.M., 2012. PCBs stimulate laccase production and activity in Pleurotus ostreatus thus promoting their removal. Folia Microbiol. (Praha). 57, 149–158. doi:10.1007/s12223-012-0106-9

Geng, J., Liu, A., 2014. Heme-dependent dioxygenases in tryptophan oxidation. Arch. Biochem. Biophys. 544, 18–26. doi:10.1016/j.abb.2013.11.009

Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.-M., 1999. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. Bioremediat. J. 3, 1–26. doi:10.1080/10889869991219163

Gibson, D.T., Parales, R.E., 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology 236–243.

Giedraityte, G., Kalėdienė, L., 2009. Catechol 1,2-dioxygenase from α-naphthol degrading thermophilic *Geobacillus* sp. strain: purification and properties. Open Life Sci. 4, 68–73. doi:10.2478/s11535-008-0049-y

Goldfeder, M., Kanteev, M., Adir, N., Fishman, A., 2013. Influencing the monophenolase/diphenolase activity ratio in tyrosinase. Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics 1834, 629–633. doi:10.1016/j.bbapap.2012.12.021

Gomaa, O.M., Momtaz, O.A., 2015. Copper induction and differential expression of laccase in Aspergillus flavus. Brazilian J. Microbiol. 46, 285–292. doi:10.1590/S1517-838246120120118

Gribble, G., 2015. Biological activity of recently discovered halogenated marine natural products. Mar. Drugs 13, 4044–4136. doi:10.3390/md13074044

Grindler, N.M., Allsworth, J.E., Macones, G.A., Kannan, K., Roehl, K.A., Cooper, A.R., 2015. Persistent organic pollutants and early menopause in U.S. women. PLoS One 10, e0116057. doi:10.1371/journal.pone.0116057

Gul, I., Sheeraz Ahmad, M., Saqlan Naqvi, S.M., Hussain, A., Wali, R., Farooqi, A.A., Ahmed, I., 2017. Polyphenol oxidase (PPO) based biosensors for detection of phenolic compounds: A Review. J. Appl. Biol. Biotechnol. 5, 72–85. doi:10.7324/JABB.2017.50313

Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Sitnik, M., Wojcieszyńska, D., 2013a. High activity catechol 1,2-dioxygenase from Stenotrophomonas maltophilia strain KB2 as a useful tool in cis,cis-muconic acid production. Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 103, 1297–1307. doi:10.1007/s10482-013-9910-8

Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Wojcieszysk, D., 2013b. Intradiol dioxygenases — The key enzymes in xenobiotics degradation, in: Chamy, R., Rosenkranz, F.

(Eds.), Biodegradation of Hazardous and Special Products. InTech, pp. 129–153. doi:10.5772/56205

Hakulinen, N., Gasparetti, C., Kaljunen, H., Kruus, K., Rouvinen, J., 2013. The crystal structure of an extracellular catechol oxidase from the ascomycete fungus *Aspergillus oryzae*. JBIC J. Biol. Inorg. Chem. 18, 917–929. doi:10.1007/s00775-013-1038-9

Halaouli, S., Record, E., Casalot, L., Hamdi, M., Sigoillot, J.-C., Asther, M., Lomascolo, A., 2006. Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*, and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70, 580–589. doi:10.1007/s00253-005-0109-4

Hatta, T., Nakano, O., Imai, N., Takizawa, N., Kiyohara, H., 1999. Cloning and sequence analysis of hydroxyquinol 1,2-dioxygenase gene in 2,4,6-trichlorophenol-degrading *Ralstonia pickettii* DTP0602 and characterization of its product. J. Biosci. Bioeng. 87, 267–272. doi:10.1016/S1389-1723(99)80030-9

Hernández, Á.R., Boada, L.D., Mendoza, Z., Ruiz-Suárez, N., Valerón, P.F., Camacho, M., Zumbado, M., Almeida-González, M., Henríquez-Hernández, L.A., Luzardo, O.P., 2015. Consumption of organic meat does not diminish the carcinogenic potential associated with the intake of persistent organic pollutants (POPs). Environ. Sci. Pollut. Res. Int. doi:10.1007/s11356-015-4477-8

Hernandez-Romero, D., Sanchez-Amat, A., Solano, F., 2006. A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio. Role of the seventh histidine and accessibility to the active site. FEBS J. 273, 257–270. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05038.x

Hillar, A., Peters, B., Pauls, R., Lobod, A., Zhang, H., Mauk, A.G., Loewen, P.C., 2000. Modulation of the activities of catalase−peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed mutagenesis. doi:10.1021/BI0000059

Hiratsuka, N., Wariishi, H., Tanaka, H., 2001. Degradation of diphenyl ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 563–571. doi:10.1007/s002530100789

Honda, M., Kannan, K., 2018. Biomonitoring of chlorophenols in human urine from several Asian countries, Greece and the United States. Environ. Pollut. 232, 487–493. doi:10.1016/j.envpol.2017.09.073

Hooived, M., Heederik, D.J.J., Kogevinas, M., Boffetta, P., Needham, L.L., Patterson, D.G., Bueno-de-Mesquita, H.B., 1998. Second follow-up of a Dutch cohort occupationally exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and contaminants. Am. J. Epidemiol. 147, 891–899. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009543

Huang, Z., Chen, G., Zeng, G., Chen, A., Zuo, Y., Guo, Z., Tan, Q., Song, Z., Niu, Q., 2015. Polyvinyl alcohol-immobilized *Phanerochaete chrysosporium* and its application in the bioremediation of composite-polluted wastewater. J. Hazard. Mater. 289, 174–183. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.02.043

Hughes, G., Lewis, J.C., 2018. Introduction: Biocatalysis in Industry. Chem. Rev. 118, 1–3. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00741

Hupert-Kocurek, K., Wojcieszyſska, D., Guzik, U., Borowski, T., Wojcieszyńska, D., Guzik, U., Borowski, T., 2015. A single amino acid substitution within catalytically non-active N-terminal domain of catechol 2,3-dioxygenase (C23O) increases enzyme activity towards 4-chlorocatechol. J. Mol. Catal. B Enzym. 122, 64–71. doi:10.1016/j.molcatb.2015.08.012

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2015. Polychlorinated biphenyls. International Agency for Research on Cancer.

Igbinosa, E.O., Odjadjare, E.E., Chigor, V.N., Igbinosa, I.H., Emoghene, A.O., Ekhaise, F.O., Igiehon, N.O., Idemudia, O.G., 2013. Toxicological profile of chlorophenols and their derivatives in the environment: the public health perspective. ScientificWorldJournal. 2013, 460215. doi:10.1155/2013/460215

Isaschar-Ovdat, S., Fishman, A., 2018. Crosslinking of food proteins mediated by oxidative enzymes – A review. Trends Food Sci. Technol. 72, 134–143. doi:10.1016/J.TIFS.2017.12.011

Iszatt, N., Stigum, H., Verner, M.-A., White, R.A., Govarts, E., Murinova, L.P., Schoeters, G., Trnovec, T., Legler, J., Pelé, F., Botton, J., Chevrier, C., Wittsiepe, J., Ranft, U., Vandentorren, S., Kasper-Sonnenberg, M., Klümper, C.,

Weisglas-Kuperus, N., Polder, A., Eggesbø, M., 2015. Prenatal and postnatal exposure to persistent organic pollutants and infant growth: A pooled analysis of seven european birth cohorts. Environ. Health Perspect. 123, 730–6. doi:10.1289/ehp.1308005

Ivanciuc, T., Ivanciuc, O., Klein, D., 2006. Prediction of environmental properties for chlorophenols with Posetic Quantitative Super-Structure/Property Relationships (QSSPR). Int. J. Mol. Sci. 7, 358–374. doi:10.3390/i7090358

Jaacks, L.M., Staimez, L.R., 2015. Association of persistent organic pollutants and non-persistent pesticides with diabetes and diabetes-related health outcomes in Asia: A systematic review. Environ. Int. 76, 57–70. doi:10.1016/j.envint.2014.12.001

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

Kaintz, C., Molitor, C., Thill, J., Kampatsikas, I., Michael, C., Halbwirth, H., Rompel, A., 2014. Cloning and functional expression in *E. coli* of a polyphenol oxidase transcript from *Coreopsis grandiflora* involved in aurone formation. FEBS Lett. 588, 3417–3426. doi:10.1016/j.febslet.2014.07.034

Kamei, I., Kogura, R., Kondo, R., 2006. Metabolism of 4,4′-dichlorobiphenyl by white-rot fungi Phanerochaete chrysosporium and Phanerochaete sp. MZ142. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72, 566–575. doi:10.1007/s00253-005-0303-4

Kampatsikas, I., Bijelic, A., Pretzler, M., Rompel, A., 2017. Three recombinantly expressed apple tyrosinases suggest the amino acids responsible for mono- versus diphenolase activity in plant polyphenol oxidases. Sci. Rep. 7, 8860. doi:10.1038/s41598-017-08097-5

Kanteev, M., Goldfeder, M., Fishman, A., 2015. Structure-function correlations in tyrosinases. Protein Sci. 24, 1360–1369. doi:10.1002/pro.2734

Kargi, F., Eker, S., 2005. Kinetics of 2,4-dichlorophenol degradation by *Pseudomonas putida* CP1 in batch culture. Int. Biodeterior. Biodegradation 55, 25–28.

doi:10.1016/J.IBIOD.2004.06.010

Karpievitch, Y. V, Polpitiya, A.D., Anderson, G.A., Smith, R.D., Dabney, A.R., 2010. Liquid Chromatography Mass Spectrometry-based proteomics: Biological and technological aspects. Ann. Appl. Stat. 4, 1797–1823. doi:10.1214/10-AOAS341

Kawamura-Konishi, Y., Tsuji, M., Hatana, S., Asanuma, M., Kakuta, D., Kawano, T., Mukouyama, E.B., Goto, H., Suzuki, H., 2007. Purification, characterization, and molecular cloning of tyrosinase from *Pholiota nameko*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71, 1752–1760. doi:10.1271/bbb.70171

Kengen, S., Bikker, F., Hagen, W., Vos, W., Oost, J., 2001. Characterization of a catalase-peroxidase from the hyperthermophilic archaeon Archaeoglobus fulgidus. Extremophiles 5, 323–332. doi:10.1007/s007920100208

Kennedy, J., Flemer, B., Jackson, S.A., Lejon, D.P.H., Morrissey, J.P., O'Gara, F., Dobson, A.D.W., 2010. Marine metagenomics: new tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism. Mar. Drugs 8, 608–28. doi:10.3390/md8030608

Kennedy, J., Marchesi, J.R., Dobson, A.D., 2008. Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. Microb. Cell Fact. 7, 27. doi:10.1186/1475-2859-7-27

Keum, Y.S., Li, Q.X., 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls 56, 23–30. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.02.028

Khan, S., Cao, Q., 2011. Human health risk due to consumption of vegetables contaminated with carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. J. Soils Sediments 12, 178–184. doi:10.1007/s11368-011-0427-3

Khenifi, A., Zohra, B., Kahina, B., Houari, H., Zoubir, D., 2009. Removal of 2,4-DCP from wastewater by CTAB/bentonite using one-step and two-step methods: A comparative study. Chem. Eng. J. 146, 345–354. doi:10.1016/J.CEJ.2008.06.028

Khlifi, R., Belbahri, L., Woodward, S., Ellouz, M., Dhouib, A., Sayadi, S., Mechichi, T., 2010. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. J. Hazard. Mater. 175, 802–808.

doi:10.1016/j.jhazmat.2009.10.079

Kiiskinen, L., Kruus, K., Ratto, M., 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. J. Appl. Microbiol. 640–646. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02348.x

Kudanga, T., Nemadziva, B., Le Roes-Hill, M., 2017. Laccase catalysis for the synthesis of bioactive compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101, 13–33. doi:10.1007/s00253-016-7987-5

Kumari, M., Ghosh, P., Thakur, I.S., 2018. Application of microbes in remediation of hazardous wastes: A review, in: Varjani S., Agarwal A., Gnansounou E., G.B. (Ed.), Bioremediation: Applications for Environmental Protection and Management. Energy, Environment, and Sustainability. Springer, Singapore, pp. 223–241. doi:10.1007/978-981-10-7485-1_11

Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A., Alcalde, M., 2008. Laccases and Their Applications: A Patent Review. Recent Pat. Biotechnol. 2, 10–24. doi:10.2174/187220808783330965

Kvist, L., Giwercman, A., Weihe, P., Kold Jensen, T., Grandjean, P., Halling, J., Skaalum Petersen, M., Lundberg Giwercman, Y., 2014. Exposure to persistent organic pollutants and sperm sex chromosome ratio in men from the Faroe Islands. Environ. Int. 73, 359–64. doi:10.1016/j.envint.2014.09.001

Lai, X., Soler-Lopez, M., Wichers, H.J., Dijkstra, B.W., 2016. Large-scale recombinant expression and purification of human tyrosinase suitable for structural studies. PLoS One 11, e0161697. doi:10.1371/journal.pone.0161697

Lammel, G., 2015. Long-range atmospheric transport of polycyclic aromatic hydrocarbons is worldwide problem - results from measurements at remote sites and modelling. Acta Chim. Slov. 62, 729–735. doi:10.17344/acsi.2015.1387

Lang, G., Ogawa, N., Tanaka, Y., Fujii, T., Fulthorpe, R.R., Fukuda, M., Miyashita, K., 2005. Two kinds of chlorocatechol 1,2-dioxygenase from 2,4-dichlorophenoxyacetate-degrading Sphingomonas sp. strain TFD44. Biochem. Biophys. Res. Commun. 332, 941–948. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.045

Lee, D.-H., Lind, L., Jacobs, D.R., Salihovic, S., van Bavel, B., Lind, P.M., 2012.

Associations of persistent organic pollutants with abdominal obesity in the elderly: The Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. Environ. Int. 40, 170–178. doi:10.1016/j.envint.2011.07.010

Lee, D.-H., Porta, M., Jacobs, D.R., Vandenberg, L.N., 2014. Chlorinated persistent organic pollutants, obesity, and type 2 diabetes. Endocr. Rev. 35, 557–601. doi:10.1210/er.2013-1084

Lee, S.-H., Ra, J.-S., Choi, J.-W., Yim, B.-J., Jung, M.-S., Kim, S.-D., 2014. Human health risks associated with dietary exposure to persistent organic pollutants (POPs) in river water in Korea. Sci. Total Environ. 470-471, 1362–9. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.030

Leontievsky, A.A., Myasoedova, N.M., Baskunov, B.P., Evans, C.S., Golovleva, L.A., 2000. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. Biodegradation 11, 331–40. doi:https://doi.org/10.1023/A:1011154209569

Lezzi, C., Bleve, G., Spagnolo, S., Perrotta, C., Grieco, F., 2012. Production of recombinant *Agaricus bisporus* tyrosinase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 39, 1875–1880. doi:10.1007/s10295-012-1192-z

Lim, J., Park, S.H., Jee, S.H., Park, H., 2015. Body concentrations of persistent organic pollutants and prostate cancer: a meta-analysis. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 22, 11275–84. doi:10.1007/s11356-015-4315-z

Lima, R.N., Porto, A.L.M., 2016. Recent Advances in Marine Enzymes for Biotechnological Processes, 1st ed, Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.afnr.2016.06.005

Lin, J., Milase, R.N., 2015. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. Y64 strain and *Escherichia coli* transformants. Protein J. 34, 421–433. doi:10.1007/s10930-015-9637-7

Lind, P.M., van Bavel, B., Salihovic, S., Lind, L., 2012. Circulating levels of persistent organic pollutants (POPs) and carotid atherosclerosis in the elderly. Environ. Health Perspect. 120, 38–43. doi:10.1289/ehp.1103563

Lončar, N., Fraaije, M.W., 2015. Not so monofunctional—a case of thermostable *Thermobifida fusca* catalase with peroxidase activity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 2225–2232. doi:10.1007/s00253-014-6060-5

Long, Y., Yang, S., Xie, Z., Cheng, L., 2016. Cloning, expression, and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from a phenol-degrading *Candida tropicalis* JH8 strain. Prep. Biochem. Biotechnol. 46, 673–678. doi:10.1080/10826068.2015.1135449

López-Serrano, D., Sanchez-Amat, A., Solano, F., 2002. Cloning and molecular characterization of a SDS-activated tyrosinase from *Marinomonas mediterranea*. Pigment cell Res. 15, 104–11.

M. Halaburgi, V., Sharma, S., Sinha, M., Singh, T., Karegoudar, T.B., 2011. Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes Cladosporium cladosporioides and its applications. Process Biochem. 46, 1146–1152. doi:10.1016/j.procbio.2011.02.002

Marco-Urrea, E., Reddy, C.A., 2012. Degradation of chloro-organic pollutants by white rot fungi, in: Singh S. (Ed.), Microbial Degradation of Xenobiotics. Environmental Science and Engineering. . Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 31–66. doi:10.1007/978-3-642-23789-8_2

Marino, S.M., Fogal, S., Bisaglia, M., Moro, S., Scartabelli, G., De Gioia, L., Spada, A., Monzani, E., Casella, L., Mammi, S., Bubacco, L., 2011. Investigation of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase reactivity toward chlorophenols. Arch. Biochem. Biophys. 505, 67–74. doi:10.1016/j.abb.2010.09.019

Marková, E., Kotik, M., Křenková, A., Man, P., Haudecoeur, R., Boumendjel, A., Hardré, R., Mekmouche, Y., Courvoisier-Dezord, E., Réglier, M., Martínková, L., 2016. Recombinant tyrosinase from *Polyporus arcularius* : Overproduction in *Escherichia coli* , characterization, and use in a study of aurones as tyrosinase effectors. J. Agric. Food Chem. 64, 2925–2931. doi:10.1021/acs.jafc.6b00286

Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., Inlow, J.K., 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. J. Inorg. Biochem. 100, 108–123. doi:10.1016/J.JINORGBIO.2005.10.008

Matafonova, G., Shirapova, G., Zimmer, C., Giffhorn, F., Batoev, V., Kohring, G.-W., 2006. Degradation of 2,4-dichlorophenol by *Bacillus* sp. isolated from an aeration pond in the Baikalsk pulp and paper mill (Russia). Int. Biodeterior. Biodegradation 58, 209–212. doi:10.1016/J.IBIOD.2006.06.024

Matera, I., Ferraroni, M., Kolomytseva, M., Golovleva, L., Scozzafava, A., Briganti, F., 2010. Catechol 1,2-dioxygenase from the Gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP: Quantitative structure/activity relationship and the crystal structures of native enzyme and catechols adducts. J. Struct. Biol. 170, 548–564. doi:10.1016/j.jsb.2009.12.023

Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., Sugiyama, M., 2006. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. J. Biol. Chem. 281, 8981–8990. doi:10.1074/jbc.M509785200

Matsumura, E., Ooi, S., Murakami, S., Takenaka, S., Aoki, K., 2004. Constitutive Synthesis , Purification , and Characterization of Catechol 1 , 2-Dioxygenase from the Aniline-Assimilating Bacterium Rhodococcus sp . AN-22 98, 71–76.

Mayer, A.M., Staples, R.C., 2002. Laccase : new functions for an old enzyme. Phytochemistry 60, 551–565.

Meijer, S.N., Ockenden, W.A., Sweetman, A., Breivik, K., Grimalt, J.O., Jones, K.C., 2003. Global distribution and budget of PCBs and HCB in background surface soils: Implications for sources and environmental processes. Environ. Sci. Technol. 37, 667–672. doi:10.1021/ES025809L

Micalella, C., Martignon, S., Bruno, S., Pioselli, B., Caglio, R., Valetti, F., Pessione, E., Giunta, C., Rizzi, M., 2011. X-ray crystallography, mass spectrometry and single crystal microspectrophotometry: A multidisciplinary characterization of catechol 1,2 dioxygenase. Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics 1814, 817–823. doi:10.1016/J.BBAPAP.2010.09.008

Michałowicz, J., Sicińska, P., 2009. Chlorophenols and chlorocatechols induce apoptosis in human lymphocytes (*in vitro*). Toxicol. Lett. 191, 246–252. doi:10.1016/J.TOXLET.2009.09.010

Mitro, S.D., Birnbaum, L.S., Needham, B.L., Zota, A.R., 2015. Cross-sectional associations between exposure to persistent organic pollutants and leukocyte telomere length among U.S. adults in NHANES, 2001-2002. Environ. Health Perspect. doi:10.1289/ehp.1510187

Molitor, C., Mauracher, S.G., Rompel, A., 2016. Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, E1806–E1815. doi:10.1073/pnas.1523575113

Morozova, O. V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S. V., Yaropolov, A.I., 2007. "Blue" laccases. Biochem. 72, 1136–1150. doi:10.1134/S0006297907100112

Mouhamadou, B., Faure, M., Sage, L., Marçais, J., Souard, F., Geremia, R.A., 2013. Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls. Fungal Biol. 117, 268–274. doi:10.1016/j.funbio.2013.02.004

Mountfield, R.J., Hopper, D.J., 1998. The formation of 1-hydroxymethylnaphthalene and 6-hydroxymethylquinoline by both oxidative and reductive routes in *Cunninghamella elegans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 379–383. doi:10.1007/s002530051308

Muir, D.C.G., Howard, P.H., 2006. Are there other persistent organic pollutants? A challenge for environmental chemists. Environ. Sci. Technol. 40, 7157–7166. doi:10.1021/es061677a

Mukherjee, S., Basak, B., Bhunia, B., Dey, A., Mondal, B., 2013. Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. Rev. Environ. Sci. Bio/Technology 12, 61–73. doi:10.1007/s11157-012-9302-y

Murakami, S., Wang, L., Naito, A., Shinke, R., Aoki, K., 1998. Purification and characterization of four catechol 1,2-dioxygenase isozymes from the benzamide-assimilating bacterium 153, 163–171. doi:10.1016/S0944-5013(98)80036-0

Muralikrishna, I. V., Manickam, V., 2017. Introduction, in: Muralikrishna, I. V.,

Manickam, V. (Eds.), Environmental Management: Science and Engineering for Industry. Butterworth-Heinemann, Kidlington, Oxford, pp. 1–4. doi:10.1016/B978-0-12-811989-1.00001-4

Nadaf, N.H., Ghosh, J.S., 2011. Purification and characterization of catechol 1 , 2-dioxygenase from *Rhodococcus* sp. NCIM 2891. Res. J. Environ. Earth Sci. 3, 608–613.

Nair, S., Abraham, J., 2019. Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls, in: Arora, P.K. (Ed.), Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds. Springer, Singapore, pp. 263–284. doi:10.1007/978-981-13-7462-3_13

Nakade, K., Nakagawa, Y., Yano, A., Konno, N., Sato, T., Sakamoto, Y., Avery, S., 2012. Effective induction of pblac1 laccase by copper ion in Polyporus brumalis ibrc05015. Fungal Biol. 117, 52–61. doi:10.1016/j.funbio.2012.11.005

Nakagawa, A., Osawa, S., Hirata, T., Yamagishi, Y., Hosoda, J., Horikoshi, T., 2006. 2,4-Dichlorophenol degradation by the soil fungus *Mortierella* sp. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 525–7. doi:https://doi.org/10.1271/bbb.70.525

Nakagawa, Y., Sakamoto, Y., Kikuchi, S., Sato, T., Ã, A.Y., 2010. A chimeric laccase with hybrid properties of the parental Lentinula edodes laccases. Microbiol. Res. 165, 392–401. doi:10.1016/j.micres.2009.08.006

Ngwa, E.N., Kengne, A.-P., Tiedeu-Atogho, B., Mofo-Mato, E.-P., Sobngwi, E., 2015. Persistent organic pollutants as risk factors for type 2 diabetes. Diabetol. Metab. Syndr. 7, 41. doi:10.1186/s13098-015-0031-6

Nicoletti, R., Andolfi, A., 2018. The marine-derived filamentous fungi in biotechnology, in: P. H. Rampelotto, A.T. (Ed.), Grand Challenges in Marine Biotechnology. Springer, Cham, pp. 157–189. doi:10.1007/978-3-319-69075-9_4

Nikolaivits, E., Dimarogona, M., Fokialakis, N., Topakas, E., 2017. Marine-derived biocatalysts: importance, accessing and application in aromatic pollutant bioremediation. Front. Microbiol. 8, 265.

Novotny, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E.,

Sasek, V., 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation : extracellular enzyme production and degradation rate ˇ ene ˇ as. Soil Biol. Biochem. 36, 1545–1551. doi:10.1016/j.soilbio.2004.07.019

Nunes, C.S., Kunamneni, A., 2018. Laccases-properties and applications, Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-805419-2.00007-1

Öberg, L.G., Rappe, C., 1992. Biochemical formation of PCDD/Fs from chlorophenols. Chemosphere 25, 49–52. doi:10.1016/0045-6535(92)90477-9

Okino-Delgado, C.H., Zanutto-Elgui, M.R., do Prado, D.Z., Pereira, M.S., Fleuri, L.F., 2019. Enzymatic bioremediation: Current Status, challenges of obtaining process, and applications, in: Arora, P.K. (Ed.), Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds. Springer, Singapore, pp. 79–101. doi:10.1007/978-981-13-7462-3_4

Olaniran, A.O., Igbinosa, E.O., 2011. Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes. Chemosphere 83, 1297–1306. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2011.04.009

Orser, C.S., Dutton, J., Lange, C., Jablonski, P., Xun, L., Hargis, M., 1993. Characterization of a *Flavobacterium* glutathione S-transferase gene involved reductive dechlorination. J. Bacteriol. 175, 2640–4.

Osman, D., Cavet, J.S., 2008. Copper Homeostasis in Bacteria, Advances in Applied Microbiology. Elsevier Masson SAS. doi:10.1016/S0065-2164(08)00608-4

Otto, B., Schlosser, D., 2015. First laccase in green algae : Purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from Tetracystis aeria. doi:10.1007/s00425-014-2144-9

Passarini, M.R.Z., Ottoni, C.A., Santos, C., Lima, N., Sette, L.D., 2015. Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains Nigrospora sp. CBMAI 1328 and Arthopyrenia sp. CBMAI 1330. AMB Express 5. doi:10.1186/s13568-015-0106-7

Passatore, L., Rossetti, S., Juwarkar, A.A., Massacci, A., 2014. Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): State of knowledge and research perspectives. J. Hazard. Mater. 278, 189–202. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.05.051

Patel, B.P., Kumar, A., 2017. Biodegradation and co-metabolism of monochlorophenols and 2,4-dichlorophenol by microbial consortium. CLEAN - Soil, Air, Water 45, 1700329. doi:10.1002/clen.201700329

Patnaik, P., 2007. A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances. John Wiley.

Pedrós-Alió, C., 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? Trends Microbiol. 14, 257–63. doi:10.1016/j.tim.2006.04.007

Perelló, G., Díaz-Ferrero, J., Llobet, J.M., Castell, V., Vicente, E., Nadal, M., Domingo, J.L., 2015. Human exposure to PCDD/Fs and PCBs through consumption of fish and seafood in Catalonia (Spain): Temporal trend. Food Chem. Toxicol. 81, 28–33. doi:10.1016/j.fct.2015.04.010

Poppe, L., Vértessy, B.G., 2018. The fourth wave of Biocatalysis emerges- The 13 th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations. ChemBioChem 19, 284–287. doi:10.1002/cbic.201700687

Potrawfke, T., Armengaud, J., Wittich, R.-M., 2001. Chlorocatechols substituted at positions 4 and 5 are substrates of the broad-spectrum chlorocatechol 1,2-dioxygenase of *Pseudomonas chlororaphis* RW71. J. Bacteriol. 183, 997–1011. doi:10.1128/JB.183.3.997-1011.2001

Pretzler, M., Bijelic, A., Rompel, A., 2017. Heterologous expression and characterization of functional mushroom tyrosinase (*Ab*PPO4). Sci. Rep. 7, 1810. doi:10.1038/s41598-017-01813-1

Pushpanathan, M., Jayashree, S., Gunasekaran, P., Rajendhran, J., 2014. Microbial Bioremediation: A metagenomic approach, in: Microbial Biodegradation and Bioremediation. Elsevier, pp. 407–419. doi:10.1016/B978-0-12-800021-2.00017-0

Rao, A., Pimprikar, P., Bendigiri, C., Kumar, A.R., Zinjarde, S., 2011. Cloning and expression of a tyrosinase from *Aspergillus oryzae* in *Yarrowia lipolytica*: application in L-DOPA biotransformation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 92, 951–959. doi:10.1007/s00253-011-3400-6

Reaves, D.K., Ginsburg, E., Bang, J.J., Fleming, J.M., 2015. Persistent organic pollutants and obesity: are they potential mechanisms for breast cancer promotion? Endocr. Relat. Cancer 22, R69–R86. doi:10.1530/ERC-14-0411

Ren, H., Li, Q., Zhan, Y., Fang, X., Yu, D., 2016. 2,4-Dichlorophenol hydroxylase for chlorophenol removal: Substrate specificity and catalytic activity. Enzyme Microb. Technol. 82, 74–81. doi:10.1016/j.enzmictec.2015.08.008

Ren, Q., Henes, B., Fairhead, M., Thöny-Meyer, L., 2013. High level production of tyrosinase in recombinant *Escherichia coli*. BMC Biotechnol. 13, 18. doi:10.1186/1472-6750-13-18

Rezaei, S., Shahverdi, A.R., Faramarzi, M.A., 2017. Isolation , one-step affinity purification , and characterization of a polyextremotolerant laccase from the halophilic bacterium Aquisalibacillus elongatus and its application in the delignification of sugar beet pulp. Bioresour. Technol. 230, 67–75. doi:10.1016/j.biortech.2017.01.036

Ritter, L., Solomon, K.R., Forget, J., Stameroff, M., C., O., 1995. A review of selected persistent organic pollutants for the International Programme on Chemical Safety (IPCS).

Riva, S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. Trends Biotechnol. 24, 219–226. doi:10.1016/j.tibtech.2006.03.006

Rivera-Hoyos, C.M., Morales-Álvarez, E.D., Poutou-Piñales, R.A., Pedroza-Rodríguez, A.M., RodrÍguez-Vázquez, R., Delgado-Boada, J.M., 2013. Fungal laccases. Fungal Biol. Rev. 27, 67–82. doi:10.1016/j.fbr.2013.07.001

Roy, S., Das, I., Munjal, M., Karthik, L., Kumar, G., Kumar, S., Rao, K.V.B., 2014. Isolation and characterization of tyrosinase produced by marine actinobacteria and its application in the removal of phenol from aqueous environment. Front. Biol. (Beijing). 9, 306–316. doi:10.1007/s11515-014-1324-0

Rubilar, O., Diez, M.C., Gianfreda, L., 2008. Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 38, 227–268. doi:10.1080/10643380701413351

Ruiz-Fernández, A.C., Ontiveros-Cuadras, J.F., Sericano, J.L., Sanchez-Cabeza, J.-A., Liong Wee Kwong, L., Dunbar, R.B., Mucciarone, D.A., Pérez-Bernal, L.H., Páez-Osuna, F., 2014. Long-range atmospheric transport of persistent organic pollutants to remote lacustrine environments. Sci. Total Environ. 493, 505–20. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.002

Ruzzin, J., 2012. Public health concern behind the exposure to persistent organic pollutants and the risk of metabolic diseases. BMC Public Health 12, 298. doi:10.1186/1471-2458-12-298

Sagawa, T., Yomo, T., Tsugawa, S., Takeda, Y., Ihara, H., Mitamura, E.K., Urabe, I., Ohkubo, K., 1999. A novel versatility of catalase I as a dioxygenase for indole-ring-opening dioxygenation. Chem. Lett. 28, 339–340. doi:10.1246/cl.1999.339

Santhanam, N., Vivanco, J.M., Decker, S.R., Reardon, K.F., 2011. Expression of industrially relevant laccases: Prokaryotic style. Trends Biotechnol. 29, 480–489. doi:10.1016/j.tibtech.2011.04.005

Santos, V.L., Linardi, V.R., 2004. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents-identification and degradation potential. Process Biochem. 39, 1001–1006. doi:10.1016/S0032-9592(03)00201-2

Selinheimo, E., Saloheimo, M., Ahola, E., Westerholm-Parvinen, A., Kalkkinen, N., Buchert, J., Kruus, K., 2006. Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. FEBS J. 273, 4322–4335. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05429.x

Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V.S., Adir, N., Fishman, A., 2011. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. J. Mol. Biol. 405, 227–237. doi:10.1016/j.jmb.2010.10.048

Senthivelan, T., Kanagaraj, J., Panda, R.C., 2016. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review. Biotechnol. Bioprocess Eng. 21, 19–38. doi:10.1007/s12257-015-0278-7

Seymour, J.R., 2014. A sea of microbes: the diversity and activity of marine microorganisms. Microbiol. Aust. 35, 183. doi:10.1071/MA14060

Sharma, B., Dangi, A.K., Shukla, P., 2018. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. J. Environ. Manage. 210, 10–22. doi:10.1016/J.JENVMAN.2017.12.075

Sharma, J.K., Gautam, R.K., Nanekar, S. V., Weber, R., Singh, B.K., Singh, S.K., Juwarkar, A.A., 2018. Advances and perspective in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 16355–16375. doi:10.1007/s11356-017-8995-4

Shiu, W.Y., Mackay, D., 1986. A critical review of aqueous solubilities, vapor pressures, Henry's Law constants, and octanol–water partition coefficients of the polychlorinated biphenyls. J. Phys. Chem. Ref. Data 15, 911–929. doi:10.1063/1.555755

Shuster Ben-Yosef, V., Sendovski, M., Fishman, A., 2010. Directed evolution of tyrosinase for enhanced monophenolase/diphenolase activity ratio. Enzyme Microb. Technol. 47, 372–376. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.08.008

Shuster, V., Fishman, A., 2009. Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 17, 188–200. doi:10.1159/000233506

Si, J., Peng, F., Cui, B., 2013. Purification , biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from Trametes pubescens. Bioresour. Technol. 128, 49–57. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.085

Siegbahn, P.E.M., Haeffner, F., 2004. Mechanism for catechol ring-cleavage by non-heme iron extradiol dioxygenases. J. Am. Chem. Soc. 126, 8919–8932. doi:10.1021/JA0493805

Sinniger, F., Ballantine, D., Bejarano, I., Colin, P., Pochon, X., Pomponi, S., Puglise, K., Pyle, R., Reaka, M., Spalding, H., Weil, E., 2016. Biodiversity of mesophotic coral ecosystems, in: Baker, E.K., Puglise, K.A., Harris, P.T. (Eds.), Mesophotic Coral Ecosystems: A Lifeboat for Coral Reefs? The United Nations Environment

Programme and GRID-Arendal, Nairobi and Arendal, pp. 50–62.

Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J., 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 12115–20. doi:10.1073/pnas.0605127103

Solano, F., 2014. Melanins: Skin pigments and much more—Types, structural models, biological functions, and formation routes. New J. Sci. 2014, 1–28. doi:10.1155/2014/498276

Solem, E., Tuczek, F., Decker, H., 2016. Tyrosinase versus catechol oxidase: One asparagine makes the difference. Angew. Chemie Int. Ed. 55, 2884–2888. doi:10.1002/anie.201508534

Solomon, E.I., Brunold, T.C., Davis, M.I., Kemsley, J.N., Lee, S., Lehnert, N., Neese, F., Skulan, A.J., Yang, Y., Zhou, J., 2000. Geometric and Electronic Structure / Function Correlations in Non-Heme Iron Enzymes.

Squadrone, S., Ciccotelli, V., Favaro, L., Scanzio, T., Prearo, M., Abete, M.C., 2014. Fish consumption as a source of human exposure to perfluorinated alkyl substances in Italy: analysis of two edible fish from Lake Maggiore. Chemosphere 114, 181–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.04.085

Srivastava, S., 2015. Bioremediation Technology: A greener and sustainable approach for restoration of environmental pollution, in: Garima Kaushik (Ed.), Applied Environmental Biotechnology: Present Scenario and Future Trends. Springer India, New Delhi, pp. 1–18. doi:10.1007/978-81-322-2123-4_1

Staley, J.T., Konopka, A., 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu. Rev. Microbiol. 39, 321–46. doi:10.1146/annurev.mi.39.100185.001541

Steiert, J.G., Crawford, R.L., 1986. Catabolism of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* sp. Biochem. Biophys. Res. Commun. 141, 825–830. doi:10.1016/S0006-291X(86)80247-9

Stoilova, I., Krastanov, A., Stanchev, V., Daniel, D., Gerginova, M., Alexieva, Z.,

2006. Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by *Aspergillus awamori* cells. Enzyme Microb. Technol. 39, 1036–1041. doi:10.1016/J.ENZMICTEC.2006.02.006

Stoscheck, C.M., 1990. Quantitation of protein. Methods Enzym. 182, 50–68.

Subbotina, N.M., Kolomytseva, M.P., Baskunov, B.P., Golovlev, L.A., 2016. Catechol 1,2-dioxygenase induced in *Rhodococcus opacus* strain 1CP cultured in the presence of 3-hydroxybenzoate. Microbiology 85, 638–641. doi:10.1134/S0026261716050180

Subramanian, J., Ramesh, T., Kalaiselvam, M., 2014. Fungal Laccases – Properties and Applications : A Review. Int. J. Pharm. Biol. Arch. 5, 8–16.

Sullivan, M.L., 2015. Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. Front. Plant Sci. 5. doi:10.3389/fpls.2014.00783

Sun, Y.-X., Hao, Q., Xu, X.-R., Luo, X.-J., Wang, S.-L., Zhang, Z.-W., Mai, B.-X., 2014. Persistent organic pollutants in marine fish from Yongxing Island, South China Sea: levels, composition profiles and human dietary exposure assessment. Chemosphere 98, 84–90. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.008

Svobodová, K., Cajthaml, T., 2012. Laccase activity profiling and gene expression in PCB-degrading cultures of Trametes versicolor. Int. Biodeterior. Biodegradation 71, 22–28. doi:10.1016/j.ibiod.2012.03.005

Switala, J., Loewen, P.C., 2002. Diversity of properties among catalases. Arch. Biochem. Biophys. 401, 145–154. doi:10.1016/S0003-9861(02)00049-8

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

Takgi, R., Miyashita, T., Takgi, R., Miyashita, T., 2014. A cDNA cloning of a novel alpha-class tyrosinase of *Pinctada fucata*: Its expression analysis and characterization of the expressed protein. Enzyme Res. 2014, 780549. doi:10.1155/2014/780549

Tang-Péronard, J.L., Heitmann, B.L., Andersen, H.R., Steuerwald, U., Grandjean, P., Weihe, P., Jensen, T.K., 2014. Association between prenatal polychlorinated biphenyl exposure and obesity development at ages 5 and 7 y: a prospective cohort study of 656 children from the Faroe Islands. Am. J. Clin. Nutr. 99, 5–13. doi:10.3945/ajcn.113.066720

Terasaka, S., Inoue, A., Tanji, M., Kiyama, R., 2006. Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity. Toxicol. Lett. 163, 130–141. doi:10.1016/J.TOXLET.2005.10.005

Theerachat, M., Guieysse, D., Morel, S., Remaud-Siméon, M., Chulalaksananukul, W., 2018. Laccases from marine organisms and their applications in the biodegradation of toxic and environmental pollutants: a review. Appl. Biochem. Biotechnol. doi:10.1007/s12010-018-2829-9

Tisma, M., Plazl, I., Plazi, P., Zelic, B., 2008. Modelling of L-DOPA Oxidation Catalyzed by Laccase. Chem. Biochem. Eng. Q. 307–313.

Topakas, E., Moukouli, M., Dimarogona, M., Christakopoulos, P., 2012. Expression, characterization and structural modelling of a feruloyl esterase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 94, 399–411. doi:10.1007/s00253-011-3612-9

Troeschel, S.C., Thies, S., Link, O., Real, C.I., Knops, K., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., 2012. Novel broad host range shuttle vectors for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*. J. Biotechnol. 161, 71–9. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.02.020

Tsai, S.-C., Li, Y.-K., 2007. Purification and characterization of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Candida albicans* TL3. Arch. Microbiol. 187, 199–206. doi:10.1007/s00203-006-0187-4

Tsujiyama, S., Muraoka, T., Takada, N., 2013. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) using vanillin as an activator. Biotechnol. Lett. 35, 1079–1083. doi:10.1007/s10529-013-1179-5

Turner, J.A., Babcock, R.C., Hovey, R., Kendrick, G.A., 2017. Deep thinking: a systematic review of mesophotic coral ecosystems. ICES J. Mar. Sci. 74, 2309–2320. doi:10.1093/icesjms/fsx085

Upadhyay, P., Shrivastava, R., Agrawal, P.K., 2016. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. 3 Biotech 6, 15. doi:10.1007/s13205-015-0316-3

Vacondio, B., Birolli, W.G., Ferreira, I.M., Seleghim, M.H.R., Gonçalves, S., Vasconcellos, S.P., Porto, A.L.M., 2015. Biodegradation of pentachlorophenol by marine-derived fungus *Trichoderma harzianum* CBMAI 1677 isolated from ascidian *Didemnun ligulum*. Biocatal. Agric. Biotechnol. 4, 266–275. doi:10.1016/J.BCAB.2015.03.005

Vafeiadi, M., Georgiou, V., Chalkiadaki, G., Rantakokko, P., Kiviranta, H., Karachaliou, M., Fthenou, E., Venihaki, M., Sarri, K., Vassilaki, M., Kyrtopoulos, S.A., Oken, E., Kogevinas, M., Chatzi, L., 2015. Association of prenatal exposure to persistent organic pollutants with obesity and cardiometabolic traits in early childhood: The Rhea mother-child cohort (Crete, Greece). Environ. Health Perspect. 123, 1015–21. doi:10.1289/ehp.1409062

Van Ael, E., Covaci, A., Das, K., Lepoint, G., Blust, R., Bervoets, L., 2013. Factors influencing the bioaccumulation of persistent organic pollutants in food webs of the scheldt estuary. Environ. Sci. Technol. 47, 11221–31. doi:10.1021/es400307s

Varjani, S.J., 2016. Microbial laccases and nanobiotechnology: Environmental perspective, in: Prasad, R. (Ed.), Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology. Springer, Cham, pp. 253–264. doi:10.1007/978-3-319-42990-8_12

Vested, A., Giwercman, A., Bonde, J.P., Toft, G., 2014. Persistent organic pollutants and male reproductive health. Asian J. Androl. 16, 71–80. doi:10.4103/1008-682X.122345

Vroumsia, T., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., Benoit-Guyod, J.-L., Groupe pour l'Étude du Devenir des Xénobiotiques dans l'Environnement (GEDEXE), 2005. Fungal bioconversion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-

dichlorophenol (2,4-DCP). Chemosphere 60, 1471–1480. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2004.11.102

Wahlström, B.A., 2003. Criteria for additional POPs, in: H. Fiedler (Ed.), Persistent Organic Pollutants. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 31–45. doi:10.1007/10751132_3

Wang, C., You, S., Wang, S., 2006. Purification and characterization of a novel catechol 1 , 2-dioxygenase from Pseudomonas aeruginosa with benzoic acid as a carbon source 41, 1594–1601. doi:10.1016/j.procbio.2006.03.008

Wang, X., Teng, Y., Luo, Y., Dick, R.P., 2016. Biodegradation of 3,3′,4,4′-tetrachlorobiphenyl by *Sinorhizobium meliloti* NM. Bioresour. Technol. 201, 261–268. doi:10.1016/j.biortech.2015.11.056

Westerholm-Parvinen, A., Selinheimo, E., Boer, H., Kalkkinen, N., Mattinen, M., Saloheimo, M., 2007. Expression of the *Trichoderma reesei* tyrosinase 2 in *Pichia pastoris*: Isotopic labeling and physicochemical characterization. Protein Expr. Purif. 55, 147–158. doi:10.1016/j.pep.2007.04.014

Wu, J., Chen, H., Gao, J., Liu, X., Cheng, W., Ma, X., 2010. Cloning, characterization and expression of two new polyphenol oxidase cDNAs from *Agaricus bisporus*. Biotechnol. Lett. 32, 1439–1447. doi:10.1007/s10529-010-0329-2

Wu, Y.-L., Pan, L.-P., Yu, S.-L., Li, H.-H., 2010. Cloning, microbial expression and structure–activity relationship of polyphenol oxidases from *Camellia sinensis*. J. Biotechnol. 145, 66–72. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.10.008

Xia, X., Li, H., Yang, Z., Zhang, X., Wang, H., 2015. How does predation affect the bioaccumulation of hydrophobic organic compounds in aquatic organisms? Environ. Sci. Technol. 49, 4911–20. doi:10.1021/acs.est.5b00071

Xun, L., Topp, E., Orser, C.S., 1992. Purification and characterization of a tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase from a *Flavobacterium* sp. J. Bacteriol. 174, 8003–7.

Yu, S., Chouchane, S., Magliozzo, R.S., 2009. Characterization of the W321F mutant of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase KatG. Protein Sci. 11, 58–

64. doi:10.1110/ps.09902

Yuzugullu, Y., Trinh, C.H., Smith, M.A., Pearson, A.R., Phillips, S.E. V, Sutay Kocabas, D., Bakir, U., Ogel, Z.B., McPherson, M.J., 2013. Structure, recombinant expression and mutagenesis studies of the catalase with oxidase activity from *Scytalidium thermophilum*. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 69, 398–408. doi:10.1107/S0907444912049001

Zaparucha, A., de Berardinis, V., Vaxelaire-Vergne, C., 2018. Genome mining for enzyme discovery, in: G. Williams, M.H. (Ed.), Modern Biocatalysis: Advances Towards Synthetic Biological Systems. Royal Society of Chemistry, pp. 1–27. doi:10.1039/9781788010450-00001

Zeng, S., Qin, X., Xia, L., 2017. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. Biochem. Eng. J. 119, 92–100. doi:10.1016/j.bej.2016.12.016

Zhang, D., Yang, Y., Leakey, J.E.., Cerniglia, C.E., 1996. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. FEMS Microbiol. Lett. 138, 221–226. doi:10.1016/0378-1097(96)00111-5

Zhao, D., Zhang, X., Cui, D., Zhao, M., 2012. Characterisation of a Novel White Laccase from the Deuteromycete Fungus Myrothecium verrucaria NF-05 and Its Decolourisation of Dyes. PLoS One 7. doi:10.1371/journal.pone.0038817

Zhao, F., Mayura, K., Hutchinson, R.W., Lewis, R.P., Burghardt, R.C., Phillips, T.D., 1995. Developmental toxicity and structure-activity relationships of chlorophenols using human embryonic palatal mesenchymal cells. Toxicol. Lett. 78, 35–42. doi:10.1016/0378-4274(95)99684-A

Zhao, X., Kim, S.-K., Zhu, W., Kannan, N., Li, D., 2015. Long-range atmospheric transport and the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in Changbai Mountain. Chemosphere 119, 289–94. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.06.005

Zhao, Z., Xie, Z., Möller, A., Sturm, R., Tang, J., Zhang, G., Ebinghaus, R., 2012. Distribution and long-range transport of polyfluoroalkyl substances in the Arctic, Atlantic Ocean and Antarctic coast. Environ. Pollut. 170, 71–7. doi:10.1016/j.envpol.2012.06.004

Zhuo, R., Yu, H., Yuan, P., Fan, J., Chen, L., Li, Y., Ma, F., 2018. Heterologous expression and characterization of three laccases obtained from Pleurotus ostreatus HAUCC 162 for removal of environmental pollutants. J. Hazard. Mater. 344, 499–510. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.10.055

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα Εικόνων

Εικόνα 1.1 Δομή των όλων των πιθανών ομοειδών ουσιών της ομάδας των χλωροφαινολών 4

Εικόνα 1.2 Οι δώδεκα πρώτοι ρύποι, γνωστοί ως “Dirty Dozen” που υιοθετήθηκαν από τη Σύμβαση της Στοκχόλμης 9

Εικόνα 1.3 Οι χημικές ενώσεις που έχουν κατηγοριοποιηθεί ως έμμονοι οργανικοί ρύποι (POPs) μέχρι σήμερα 11

Εικόνα 2.1 Στρατηγικές για την ανακάλυψη καινοτόμων ενζύμων από περιβαλλοντικά δείγματα. 23

Εικόνα 2.2 Στρατηγικές πρωτεϊνικής μηχανικής για βελτίωση των ιδιοτήτων ενζύμων. 28

Εικόνα 2.3 Τα ενεργά κέντρα της λακκάσης CotA του *Bacillus subtilis* (Dwivedi et al., 2011)..... 33

Εικόνα 2.4 Ο κύκλος κατάλυσης της λακκάσης. Το υπόστρωμα οξειδώνεται από το χαλκό T1 και τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω ενός εξαιρετικά διατηρημένου τριπεπτιδίου HIS-Cys-His στους χαλκούς T2 και T3. Εκεί λαμβάνει χώρα η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. (Rivera-Hoyos et al., 2013)..... 34

Εικόνα 2.5 Δράση των πολυφαινολοξειδασών. Υδροξυλίωση φαινολικών υποστρωμάτων και σύνθεση κατεχολικών. Περαιτέρω οξείδωση αυτών σε κινόνες που υφίστανται μη ενζυμικές αντιδράσεις. 36

Εικόνα 2.6 Προϊόντα διάσπασης κατεχολικού δακτυλίου από 1,2-διοξυγενάση της κατεχόλης (C12O) και 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης (C23O). 38

Εικόνα 3.1 Πλασμιδιακός φορέας ετερόλογης έκφρασης pPIZαA για το σύστημα της *P. pastoris* στον οποίο διακρίνεται το σημείο στο οποίο κλωνοποιήθηκε το γονίδιο *Tt60685*. Με μωβ βέλη επισημαίνονται τα σημεία που κόβουν τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν (*Eco*RI και *Xba*I). 55

Εικόνα 4.1 Προτεινόμενη μεταβολική οδός για την αποτοξικοποίηση της 2,4-DCP από τους απομονωμένους μεσόφωτους μύκητες. Τα ισομερή προτάθηκαν σύμφωνα με τα δεδομένα MS/MS και τη βιβλιογραφία. Για μεταβολίτες όπου δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με το πιο πιθανό ισομερές, ένας αστερίσκος έχει προστεθεί δίπλα στο μόριο. Ο αριθμός δίπλα σε κάθε ένωση είναι εκείνος που αντιστοιχεί στον Πίνακα 4.2. 73

Εικόνα 4.2 Προτεινόμενη μεταβολική οδός για την αποτοξικοποίηση της 2,4-DCP από τους απομονωμένους μύκητες. Τα ισομερή προτάθηκαν σύμφωνα με τα δεδομένα MS και τη βιβλιογραφία. Για μεταβολίτες όπου δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με το πιο πιθανό ισομερές, ένας αστερίσκος έχει προστεθεί δίπλα στο μόριο. Ο αριθμός δίπλα σε κάθε ένωση είναι εκείνος που αντιστοιχεί στον Πίνακα 4.4. 81

Εικόνα 6.1 Ηλεκτροφόρηση (A) SDS-PAGE και (B) IEF (isoelectic focusing) για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και του ισοηλεκτρικού σημείου της απομονωμένης πρωτεΐνης. 94

Εικόνα 6.2 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης των πρωτεομικών δεδομένων μέσω του λογισμικού Mascot για την C12O. (A) Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες με την μεγαλύτερη επικάλυψη πεπτιδίων, από τις οποίες έχουν υπογραμμιστεί οι καταχωρήσεις που υποδηλώνουν δράση καταλάσης. (B) Η αλληλουχία με την υψηλότερη επικάλυψη (κόκκινα γράμματα) με την απομονωμένη πρωτεΐνη. 96

Εικόνα 6.3 Ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE των απομονωμένων πρωτεϊνών. Στο πήκτωμα φαίνονται η Lac1 και η Lac, ενώ ανάμεσά τους είναι οι πρότυπες πρωτεΐνες (M) 109

Εικόνα 7.1 Δοκιμασία τρυβλίου για εντοπισμό ενεργότητας των μετασχηματισμένων αποικιών σε σύγκριση με το φυσικό στέλεχος *P. pastoris* X-33 (πάνω δεξιά τετράγωνο) για τον εντοπισμό ενεργότητας PPO. 121

Εικόνα 7.2 SDS-PAGE γέλη της καθαρής *Tt*PPO. Τα δείγματα έτρεξαν κάτω από (A) αποδιατακτικές είτε (B) φυσικές συνθήκες. Λωρίδες: M, πρότυπα μοριακά

βάρη; 1A και 1B, ανεπεξέργαστη *Tt*PPO; 2A και 2B, απογλυκοζυλιωμένη *Tt*PPO. 123

Εικόνα 7.3 Ευθυγράμιση αλληλουχίας με βάση τη δομή για τις *Tt*PPO, *Ao*CO (PDB ID: 4J3R), *Sc*Tyr (PDB ID: 1WX2) και *Bm*Tyr (PDB ID: 3NM8). Οι ιστιδίνες που συντονίζουν τα ιόντα χαλκού υποδεικνύονται με τα μπλε τρίγωνα για τον χαλκό A (CuA) και πράσινα τρίγωνα για τον χαλκό B (CuB). Τα αμινοξέα που έχουν μεταλλαχθεί υποδεικνύονται με τα μπλε βέλη. Το πιθανό σημείο πέψης της πρωτεάσης στο αμινοτελικό άκρο υποδεικνύεται με φούξια βέλος. Τα μπλε πλαίσια υποδεικνύουν εισαγωγές που υπάρχουν στις αλληλουχίες των *Tt*PPO και *Ao*CO..... 124

Εικόνα 7.4 Χημικές δομές των ενώσεων που οξειδώνει η *Tt*PPO. 130

Εικόνα 7.5(A) Αναπαράσταση ολόκληρης της δομής του μοντέλου της *Tt*PPO. Το ενεργό κέντρο περικλείεται στο μπεζ πλαίσιο. (B) Το ενεργό κέντρο του ενζύμου με τις ιστιδίνες που συντονίζουν τους χαλκούς και τα αμινοξέα που μεταλλάχθηκαν (με πράσινο). (C) Ενεργό κέντρο του L306A. (D) Ενεργό κέντρο του G292N/Y296V. 132

Εικόνα 7.6 Χρωματογραφήματα HPLC της αντίδρασης (A) 3-CP (μπλε: κοντρόλ, κόκκινο: φυσικό ένζυμο *Tt*PPO, πράσινο: G292N/L306A) στο οποίο φαίνεται και η 4-χλωροκατεχόλη (4-CC) ως προϊόν και (B) 3,5-DCP (μπλε: κοντρόλ, κόκκινο: φυσικό ένζυμο *Tt*PPO, πράσινο: G292N/Y296V)..... 137

Παράρτημα Πινάκων

Πίνακας 3.1 Χημικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν ως υποστρώματα των απομονωμένων λακκασών, ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας τους (ε) για το αντίστοιχο μήκος κύματος (λmax). 52

Πίνακας 3.2 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γονιδίου της *Tt*PPO, για την απομάκρυνση του ιντρονίου, καθώς και για τις μεταλλάξεις σημείου. 54

Πίνακας 4.1 Ποσοστό απομάκρυνσης της 2,4-DCP από resting-cell αντιδράσεις τη 10η μέρα. Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με βάση την ITS αλληλουχία τους. Πληροφορίες σχετικές με το ασπόνδυλο και την τοποθεσία από την οποία απομονώθηκαν: Ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα (Med E), Δυτική Μεσόγειο Θάλασσα (Med W), βόρεια Ερυθρά Θάλασσα (Eilat) και θάλασσα Ανταμάν (Andaman). 63

Πίνακας 4.2 Μεταβολίτες της 2,4-DCP που εντοπίστηκαν στις resting-cell αντιδράσεις. Rt: χρόνος έκλουσης, $[M - H]^-$: m/z του ψευδομοριακού ιόντος, EC: στοιχειακή σύνθεση, MS^2: τα κύρια MS/MS θραύσματα για κάθε ψευδομοριακό ιόν μαζί με τα αντίστοιχα EC. 68

Πίνακας 4.3 Ποσοστό απομάκρυνσης της 2,4-DCP από resting-cell αντιδράσεις τη 10η μέρα. Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με βάση την ITS αλληλουχία τους. Πληροφορίες σχετικές με το ασπόνδυλο και την τοποθεσία από την οποία απομονώθηκαν: Ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα (Med E), Ερυθρά Θάλασσα (Red) και θάλασσα Ανταμάν (Andaman). 74

Πίνακας 4.4 Μεταβολίτες της 2,4-DCP που εντοπίστηκαν στις resting-cell αντιδράσεις. Rt: χρόνος έκλουσης, [M − H]-: m/z του ψευδομοριακού ιόντος, EC: στοιχειακή σύνθεση. 78

Πίνακας 5.1 Ποσοστό απομάκρυνσης του PCB29 από τα απομονωμένα στελέχη της βιβλιοθήκης TARMIC ύστερα από 10 ημέρες. 84

Πίνακας 5.2 Ποσοστό απομάκρυνσης του PCB29 από τα απομονωμένα στελέχη της βιβλιοθήκης MICLIB ύστερα από 10 ημέρες. 86

Πίνακας 6.1 Ειδική ενεργότητα της CatC12O σε κατεχολικά υποστρώματα καθώς και στο υπεροξείδιο του υδρογόνου. 102

Πίνακας 6.2 Κινητικές σταθερές της CatC12O σε δύο κατεχολικά υποστρώματα. 103

Πίνακας 6.3 Εξειδίκευση των λακκασών Lac1 και Lac2 για την οξείδωση διαφορετικών υποστρωμάτων. 113

Πίνακας 7.1 Κινητικές σταθερές της *Tt*PPO σε διαφορετικά φαινολικά υποστρώματα. Στις παρενθέσεις παρουσιάζεται η τυπική απόκλιση κάθε τιμής. 127

Πίνακας 7.2 Ειδική ενεργότητα της *Tt*PPO σε διαφορετικά φαινολικά υποστρώματα. Η συγκέντρωση των υποστρωμάτων ήταν 5 mM. Στις παρενθέσεις παρουσιάζεται η τυπική απόκλιση κάθε τιμής. 128

Πίνακας 7.3 Σχετική ενεργότητα της TtPPO σε διάφορα υποστρώματα σε σύγκριση με την ενεργότητα στην κατεχόλη (100%). Η ειδική ενεργότητα σε κατεχόλη ήταν 0,34 U/mg. Η συγκέντρωση όλων των υποστρωμάτων ήταν 5 mM. Οι αντιδράσεις τερματίστηκαν μετά από 20 h στους 35 °C. 129

Παράρτημα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 4.1 Χρονική πορεία της εξωκυτταρικής ενεργότητας 1,2-διοξυγενάσης της κατεχόλης (C12O) εκφρασμένη σε U mg^{-1} πρωτεΐνης για τα 4 επιλεγμένα στελέχη και η οποία είχε επαχθεί με 1 mM 2,4-DCP. στελέχη: *Cladosporium* sp ML6-S1 (●), *Aspergillus* sp ML147-S2 (○), *Penicillium chrysogenum* ML156-S8 (▼) και *Tritirachium* sp ML197-S3 (Δ). 76

Διάγραμμα 5.1 Έκφραση ενεργότητας λακκάσης κατά την απομάκρυνση του PCB29 από τους επιλεγμένους μύκητες: *Cladosporium* sp. TM138-S3 (●), *Purpureocillium lilacinum* TM138-S4 (○) και *Alternaria* sp. TM141-S1 (▲)..... 90

Διάγραμμα 6.1 Φάσμα UV/Vis της απομονωμένης πρωτεΐνης στο οποίο φαίνεται με λεπτομέρεια η περιοχή από 350-700 nm..... 97

Διάγραμμα 6.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα (A) και στη σταθερότητα (B) της απομονωμένης CatC12O. Για τη μελέτη της σταθερότητας το ένζυμο επωάστηκε στους 50 ^{o}C (μαύρο), 60 ^{o}C (γκρι) και 70 ^{o}C (λευκό)..... 99

Διάγραμμα 6.3 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αλάτων NaCl (μαύρο) και $MgCl_2$ (γκρι) στην ενεργότητα της απομονωμένης CatC12O. Οι σχετικές ενεργότητες υπολογίστηκαν με βάση την ενεργότητα χωρίς την προσθήκη άλατος. 100

Διάγραμμα 6.4 Εναπομείνασα ενεργότητα καταλάσης (μαύρο) και C12O (γκρι) ύστερα από επώαση με NaN_3 και $AgNO_3$ σε μοριακές αναλογίες (παρεμποδιστής προς ένζυμο) 100:1 και 10000:1. 101

Διάγραμμα 6.5 Επίδραση διαφορετικών ουσιών στην επαγωγή ενεργότητας λακκάσης από τον *Cladosporium* sp. TM138-S3. 105

Διάγραμμα 6.6 Επίδραση συγκέντρωσης χαλκού στην ενεργότητα λακκάσης που εκφράζει ο *Cladosporium* sp. TM138-S3. 107

Διάγραμμα 6.7 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα των λακκασών Lac1 (●) και Lac2 (○). 111

Διάγραμμα 6.8 Επίδραση του pH της αντίδρασης στην ενεργότητα των λακκασών Lac1 (●) και Lac2 (○) για ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικών φωσφορικών (pH 2-6), φωσφορικών (pH 6-7) και Tris-HCl (pH 8-9). 112

Διάγραμμα 6.9 Ποσοστιαία μείωση συγκέντρωσης του PCB29 μετά το πέρας 20 ωρών παρουσία μεσολαβητή ABTS, είτε απουσία για τις λακκάσες Lac1 (μαύρο) και Lac2 (γκρι). 115

Διάγραμμα 7.1 Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε χαρακτηρισμένες PPO με γνωστή τρισδιάστατη δομή. Οι ομοιότητα και η επικάλυψη (στην παρένθεση) παρουσιάζονται σε ποσοστά % για κάθε αλληλουχία σύμφωνα με τα αποτελέσματα του BLAST σε σύγκριση με την *Tt*PPO. Συντομογραφίες: PPO- polyphenol oxidase, CO- catechol oxidase, Tyr- tyrosinase, AUS- aurone synthase, Ao- *Aspergillus oryzae*, Bm- *Bacillus megaterium*, Sc- *Streptomyces castaneoglobisporus*, Ib- *Iponomea batatas*, Cg- *Coreopsis grandiflora*, Vv- *Vitis vinifera*, Jr- *Juglans regia*, Tr- *Trichoderma reesei*, Pa- *Polyporus arcularius*, Pn- *Pholiota nameko*, Ab- *Agaricus bisporus*. 119

Διάγραμμα 7.2 Επίδραση της θερμοκρασίας (A) και του pH (B) στην ενεργότητα του απομονωμένου ανασυνδυασμένου ενζύμου. Η συγκέντρωση ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 8,6 μg mL^{-1}. 125

Διάγραμμα 7.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ανασυνδυασμένου ενζύμου στους 40 (λευκό), 50 (ανοιχτό γκρι), 60 (σκούρο γκρι) και 70 (μαύρο) °C. το ένζυμο επωάστηκε σε συγκέντρωση 1,1 mg mL-1..... 126

Διάγραμμα 7.4 Ενεργότητα του φυσικού ενζύμου της *Tt*PPO (μαύρο, 43 μg mL^{-1}) και των μεταλλαγμάτων της G292N (πράσινο, 77 μg mL^{-1}), L306A (μπλε, 52 μg mL^{-1}), Y296V (μωβ, 52 μg mL^{-1}), G292N/L306A (κίτρινο, 50 μg mL^{-1}) και G292N/Y296V (πορτοκαλί, 54 μg mL^{-1}) μετρημένες μετά από 16 h στους 35 ^{o}C σε φαινόλη, μονο- (A) και δι-χλωροφαινόλες (B). 135