



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Διερεύνηση ενζυμικού δυναμικού λιγνινολυτικών μυκήτων για την αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Μαρία Κυριακίδη

Επιβλέπων:

Ευάγγελος Τόπακας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, 2021

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κυρίου Ευάγγελου Τόπακα. Ολοκληρώνοντας την ερευνητική αυτή εργασία, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου προς όλους όσους συνέβαλλαν, άμεσα και έμμεσα, στην επιτυχή διεκπεραίωση της προσπάθειάς μου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ευάγγελο Τόπακα, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω υπό την επίβλεψή του, στο περιβάλλον ενός ενεργού και φιλικού εργαστηρίου. Το εύρος γνώσεων και η ερευνητική του δράση, σε συνδυασμό με το ειλικρινές ενδιαφέρον και την ουσιαστική καθοδήγησή του αποτελούν παράδειγμα προς μίμηση. Η εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου και η συνεχής υποστήριξή του με τιμούν ιδιαίτερα και τον ευχαριστώ προσωπικά για αυτό.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Αναστασία Ζέρβα για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής μου εργασίας. Την ευχαριστώ προσωπικά για την άψογη συνεργασία, το αμείωτο ενδιαφέρον, τη συνεχή υποστήριξη και την υπομονή της. Οι λέξεις είναι φτωχές προκειμένου να εκφράσουν τις ευχαριστίες μου προς το πρόσωπό της, μιας και ήταν πάντα διαθέσιμη να μου προσφέρει τις γνώσεις, την επιστημονική της εμπειρία και τις συμβουλές της.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας. Το υπέροχο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν, τόσο σε φιλικό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο, συντέλεσε στην ομαλή ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Χριστίνα Φερούση και τους υποψήφιους διδάκτορες Χριστίνα Πεντάρη και Ρωμανό Σιαπέρα για την ουσιαστική συμβολή τους.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς την οικογένειά μου και το κοντινό φιλικό μου περιβάλλον για την συμπαράσταση που μου προσέφεραν κατά την περίοδο της φοιτητικής μου σταδιοδρομίας στο Ε.Μ.Π., αλλά και για τη συνεχή υποστήριξή τους στην προσπάθειά μου να πετύχω τους στόχους μου.

Μαρία Κυριακίδη,

Αθήνα 2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Βασιδιομύκητες λευκής σήψης διαθέτουν ισχυρές ικανότητες αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας μέσω της παραγωγής τόσο υδρολυτικών όσο και οξειδωτικών ενζύμων. Η ικανότητα αποικοδόμησης όλων των συστατικών της λιγνινοκυτταρίνης καθιστά το ενζυμικό σύστημα των Βασιδιομυκήτων πολύτιμο βιοτεχνολογικό εργαλείο, ενώ μπορεί να αποτελέσει πηγή ανακάλυψης καινοτόμων ενζύμων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε το ενζυμικό σύστημα τριών ελληνικών στελεχών Βασιδιομυκήτων (*Pleurotus citrinopileatus*, *Abortiporus biennis* και *Ganoderma resinaceum*) κατά την ανάπτυξή τους σε ξυλάνη βρώμης και σε στελέχη αραβοσίτου. Τα αποτελέσματα της μελέτης φανέρωσαν την παρουσία ποικίλων ενζυμικών ενεργοτήτων, με τα οξειδωτικά ένζυμα να διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην αποικοδόμηση της βιομάζας. Το ενζυμικό προφίλ των *P. citrinopileatus* και *A. biennis* επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα πρωτεομικής ανάλυσης του εξωκυτταρικού εκχυλίσματος, με βάση τα οποία επιλέχθηκε το στέλεχος *A. biennis* για την απομόνωση δύο καινοτόμων λακκάσων. Τα δύο ένζυμα απομονώθηκαν από το εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας του μικροοργανισμού σε στελέχη αραβοσίτου μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής και ακολούθησε βιοχημικός χαρακτηρισμός τους. Οι καθарές λακκάσες *AbiLac1* και *AbiLac2*, με μοριακά βάρη 63 και 70 kDa, βέλτιστη θερμοκρασία δράσης 50°C και 60-65°C, και βέλτιστο pH δράσης 5,5, και 4,5, βάσει μετρήσεων σε κατεχόλη, αντίστοιχα, μπορούν να οξειδώσουν ένα μεγάλο εύρος φαινολικών και μη φαινολικών ενώσεων. Οι σταθερές Michaelis-Menten, K_M και v_{max} , ως προς το ABTS υπολογίστηκαν ίσες με 51 μM και 32,3 Units/mg για την *AbiLac1*, και 22 μM και 8,2 Units/mg για την *AbiLac2*, ενώ τα αντίστοιχα μεγέθη για την κατεχόλη ήταν 2565 και 64,3 Units/mg, και 942 μM και 14,7 Units/mg. Τέλος, δοκιμάστηκε η χρήση των δύο καθαρών ενζύμων σε εφαρμογές βιοαποικοδόμησης ρύπων, με την *AbiLac1* να πετυχαίνει υψηλά ποσοστά βιομετατροπής τόσο της τετρακυκλίνης όσο και των χλωροφαινολών. Επομένως, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καταδεικνύουν τη μεγάλη βιοτεχνολογική αξία του ενζυμικού συστήματος των Βασιδιομυκήτων λευκής σήψης, το οποίο μπορεί να φανεί πολύτιμο, τόσο στην αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας προς προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, όσο και σε εφαρμογές βιοεξυγίανσης και βιοαποικοδόμησης περιβαλλοντικών ρύπων.

Λέξεις-Κλειδιά: Βασιδιομύκητες, *Pleurotus citrinopileatus*, *Abortiporus biennis*, *Ganoderma resinaceum*, αποικοδόμηση λιγνινοκυτταρίνης, καθαρισμός ενζύμων, λακκάση

ABSTRACT

White-rot Basidiomycetes are powerful decomposers of lignocellulosic biomass by producing both hydrolytic and oxidative enzymes. The ability to degrade all the constituents of lignocellulose makes the enzymatic system of Basidiomycetes a valuable biotechnological tool, and also a source for the discovery of novel enzymes. In the present work, the enzymatic system of three Greek strains of Basidiomycetes (*Pleurotus citrinopileatus*, *Abortiporus biennis* and *Ganoderma resinaceum*) was investigated, during their growth in oat spelt xylan and corn stover. The results of this study revealed the presence of a variety of enzymatic activities, with the oxidative enzymes playing a crucial role in the degradation of biomass. The enzymatic profile of *P. citrinopileatus* and *A. biennis* was confirmed by secretome analysis, based on which *A. biennis* was selected for the isolation of two novel laccases. The two enzymes were isolated from the culture supernatant of this fungal strain with ion-exchange chromatography and were biochemically characterized. The purified laccases *AbiLac1* και *AbiLac2*, with molecular weights of 63 and 70 kDa, optimum temperature 50°C and 60-65°C, and optimum pH 5,5, and 4,5, based on catechol enzymatic activity measurements, respectively, are able to oxidize a wide range of phenolic and non-phenolic compounds. The Michaelis-Menten constants, K_M και v_{max} , using ABTS as substrate, were equal to 51 μM and 32,3 Units/mg for *AbiLac1*, and 22 μM and 8,2 Units/mg for *AbiLac2*, while the corresponding measurements for catechol were 2565 and 64,3 Units/mg, and 942 μM and 14,7 Units/mg. Finally, the two purified enzymes were used in pollutants biodegradation applications, with *AbiLac1* achieving high biotransformation yields for both tetracycline and chlorophenols. Overall, the results of the present study demonstrate the great biotechnological potential of the enzymatic system of white-rot Basidiomycetes, which can be of value not only in the valorization of lignocellulosic biomass towards high-added value products, but also in bioremediation and biodetoxification applications.

Keywords: Basidiomycetes, *Pleurotus citrinopileatus*, *Abortiporus biennis*, *Ganoderma resinaceum*, degradation of lignocellulose, enzyme purification, laccase

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή.....	9
1.1	Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα	10
1.1.1	Σύσταση	11
1.1.1.1	Κυτταρίνη.....	11
1.1.1.2	Ημικυτταρίνη	11
1.1.1.3	Λιγνίνη	13
1.1.2	Πηγές λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας.....	14
1.1.2.1	Στελέχη αραβοσίτου (Corn stover).....	15
1.2	Μύκητες.....	15
1.2.1	Βασιδιομύκητες	18
1.2.1.1	Το γένος <i>Pleurotus</i>	19
1.2.1.2	Το γένος <i>Ganoderma</i>	21
1.2.1.3	Το γένος <i>Abortiporus</i>	22
1.3	Ενζυμικό σύστημα αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρίνης από Βασιδιομύκητες	24
1.3.1	Ενζυμικό σύστημα αποικοδόμησης κυτταρίνης και ημικυτταρίνης	24
1.3.1.1	Εφαρμογές.....	26
1.3.2	Ενζυμικό σύστημα αποικοδόμησης λιγνίνης	26
1.3.2.1	Λακκάσες	27
1.3.2.2	Υπεροξειδάσες.....	30
1.3.2.3	Εφαρμογές.....	32
1.4	Στόχος.....	34
2	Υλικά και Μέθοδοι.....	35
2.1	Υλικά.....	35
2.1.1	Μικροοργανισμοί	35
2.1.2	Χημικά Αντιδραστήρια και Αναλώσιμα Υλικά	35
2.1.3	Ρυθμιστικά Διαλύματα	35
2.1.4	Συσκευές – Όργανα.....	36
2.2	Μέθοδοι.....	37
2.2.1	Καλλιέργειες και θρεπτικά μέσα	37
2.2.1.1	Καλλιέργειες σε ξυλάνη βρώμης.....	37
2.2.1.2	Καλλιέργειες σε στελέχη αραβοσίτου	38
2.2.1.3	Καλλιέργειες για πρωτεομική ανάλυση.....	40

2.2.2	Μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων	40
2.2.2.1	Μέτρηση ενεργότητας ενδο-1,4-β-ξυλανάσης	40
2.2.2.2	Μέτρηση ενεργότητας εστεράσης	41
2.2.2.3	Μέτρηση ενεργότητας β-ξυλοζιδάσης	42
2.2.2.4	Μέτρηση ενεργότητας λακκάσης.....	43
2.2.2.5	Μέτρηση ενεργότητας οξειδάσης των αρυλ-αλκοολών.....	43
2.2.2.6	Μέτρηση ενεργότητας κυτταρινάσης	45
2.2.2.7	Μέτρηση ενεργότητας εστεράσης του οξικού οξέος.....	45
2.2.2.8	Μέτρηση ενεργότητας γλυκουρονικής εστεράσης.....	46
2.2.2.9	Μέτρηση ενεργότητας αραβινοφουρανοζιδάσης	47
2.2.2.10	Μέτρηση ενεργότητας εστεράσης του φερουλικού οξέος.....	47
2.2.2.11	Μέτρηση ενεργότητας ευέλικτης υπεροξειδάσης.....	48
2.2.2.12	Μέτρηση ενεργότητας οξειδάσης της γαλακτόζης.....	48
2.2.3	Μέθοδοι ποσοτικοποίησης προϊόντων ενζυμικής δράσης.....	49
2.2.3.1	Προσδιορισμός των συνολικών αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)	49
2.2.3.2	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	50
2.2.4	Υδρόλυση υποστρωμάτων με ενζυμικά συμπυκνώματα.....	52
2.2.4.1	Προετοιμασία αντιδράσεων και επώαση	53
2.2.4.2	Ανάλυση προϊόντων υδρόλυσης με HPLC.....	53
2.2.5	Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.....	54
2.2.6	Απομόνωση και καθαρισμός ενζύμων	54
2.2.6.1	Παραλαβή και συμπύκνωση υπερκείμενου υγρού καλλιέργειας.....	55
2.2.6.2	Εξισορρόπηση με διαπίδυση	55
2.2.6.3	Απομόνωση των λακκασών <i>AbiLac1</i> και <i>AbiLac2</i> με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	56
2.2.6.4	Ηλεκτροφορητικές τεχνικές.....	59
2.2.7	Χαρακτηρισμός καθαρών πρωτεϊνών	61
2.2.7.1	Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης	62
2.2.7.2	Αξιολόγηση οξειδωσης υποστρωμάτων	63
2.2.7.3	Μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα	63
2.2.7.4	Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten	64
2.2.7.5	Μελέτη θερμοκρασιακής σταθερότητας.....	66

2.2.8	Χρήση των καθαρών ενζύμων, <i>AbiLac1</i> και <i>AbiLac2</i> , σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές	66
2.2.8.1	Εφαρμογή των ενζύμων <i>AbiLac1</i> και <i>AbiLac2</i> για τη βιομετατροπή της τετρακυκλίνης.....	66
2.2.8.2	Εφαρμογή των ενζύμων <i>AbiLac1</i> και <i>AbiLac2</i> για τη βιομετατροπή των χλωροφαινολών.....	68
2.2.9	Πρωτεομική και βιοπληροφορική ανάλυση	69
2.2.9.1	Προετοιμασία δειγμάτων.....	69
2.2.9.2	Πρωτεομική Ανάλυση.....	69
2.2.9.3	Βιοπληροφορική Ανάλυση	69
3	Αποτελέσματα	71
3.1	Ενζυμικό προφίλ σε καλλιέργειες ξυλάνης	71
3.2	Ενζυμικό προφίλ σε καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου	72
3.2.1	Λοιπές ενζυμικές ενεργότητες.....	74
3.2.2	Υδρόλυση υποστρωμάτων με ενζυμικά συμπυκνώματα.....	76
3.3	Πρωτεομική ανάλυση	78
3.3.1	Ανάλυση του εξωκυτταρικού πρωτεώματος του <i>P. citrinopileatus</i>	78
3.3.2	Ανάλυση του εξωκυτταρικού πρωτεώματος του <i>A. biennis</i>	80
3.4	Απομόνωση και καθαρισμός των ενζύμων <i>AbiLac1</i> και <i>AbiLac2</i>	83
3.4.1	Απομόνωση λακκασών με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	84
3.4.2	Αποτελέσματα ηλεκτροφορητικών τεχνικών	86
3.5	Χαρακτηρισμός καθαρών ενζύμων <i>AbiLac1</i> και <i>AbiLac2</i>	87
3.5.1	Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης.....	87
3.5.1.1	Βέλτιστο pH δράσης	87
3.5.1.2	Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης.....	89
3.5.2	Αξιολόγηση οξειδωσης υποστρωμάτων.....	90
3.5.3	Μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα.....	92
3.5.4	Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten.....	93
3.5.5	Μελέτη θερμοκρασιακής σταθερότητας	95
3.6	Αξιοποίηση των καθαρών ενζύμων, <i>AbiLac1</i> και <i>AbiLac2</i> , σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.....	97
3.6.1	Βιομετατροπή της τετρακυκλίνης.....	97
3.6.2	Βιομετατροπή των χλωροφαινολών.....	97
3.7	Βιοπληροφορική ανάλυση γονιδίων λακκασών	98

4	Συζήτηση αποτελεσμάτων – Συμπεράσματα	102
4.1	Διερεύνηση ενζυμικού προφίλ Βασιδιομυκήτων	102
4.2	Χαρακτηρισμός απομονωμένων λακκασών	103
4.3	Αξιοποίηση των απομονωμένων λακκασών σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές	105
4.3.1	Βιομετατροπή τετρακυκλίνης.....	105
4.3.2	Βιομετατροπή χλωροφαινολών.....	106
4.4	Συμπεράσματα.....	107
4.5	Μελλοντικοί στόχοι	108
5	Βιβλιογραφία	109
6	Παράρτημα	120
6.1	Παράρτημα Α: Φάσματα UV-Vis από το πείραμα αξιολόγησης οξείδωσης υποστρωμάτων.....	120
6.1.1	Οξείδωση υποστρωμάτων από τη λακκάση <i>AbiLac1</i>	120
6.1.2	Οξείδωση υποστρωμάτων από τη λακκάση <i>AbiLac2</i>	123

1 Εισαγωγή

Οι Βασιδιομύκητες, μαζί με τους Ασκομύκητες, αποτελούν τα μεγαλύτερα σε πληθυσμό φύλα των μυκήτων και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας του οικοσυστήματος. Αποτελούν τους κυριότερους αποικοδομητές λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας στα περισσότερα οικοσυστήματα, διαδραματίζοντας ουσιαστικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα και άλλων θρεπτικών ουσιών. Οι μύκητες αυτοί μπορούν να αποικήσουν μια μεγάλη ποικιλία τύπων ξύλου, σε διαφορετικά στάδια αποσύνθεσης και σε διαφορετικά περιβάλλοντα¹.

Η λιγνινοκυτταρίνη, το κύριο συστατικό του ξύλου και γενικότερα της φυτικής βιομάζας, είναι ένα σύνθετο μείγμα πολυμερών, αποτελούμενο, κυρίως, από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Αποτελεί την κύρια ανανεώσιμη οργανική ύλη στη φύση, με την ετήσια παγκόσμια παραγωγή να ανέρχεται σε 10-50 δισεκατομμύρια τόνους¹. Ωστόσο, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στην αποικοδόμηση λόγω της χαρακτηριστικής πολυμερικής δομής της, η οποία παρέχει προστασία από τη μικροβιακή προσβολή και την ενζυμική δράση. Οι μύκητες που αποσυνθέτουν το ξύλο, προκειμένου να το χρησιμοποιήσουν ως υπόστρωμα και να αποκτήσουν πρόσβαση στα θρεπτικά συστατικά του, έχουν αναπτύξει ιδιαίτερους μηχανισμούς ανάπτυξης, καθώς και μεταβολικές και ενζυμικές ιδιότητες. Δεδομένης της πολύπλοκης δομής της λιγνινοκυτταρίνης, η αποικοδόμησή της απαιτεί τη συνεργιστική δράση μίας πληθώρας οξειδωτικών και υδρολυτικών ενζύμων, τα οποία εκκρίνονται από τους Βασιδιομύκητες σε διαφορετικές αναλογίες, οι οποίες εξαρτώνται από τη σύσταση της βιομάζας, καθώς και από τον ίδιο τον μικροοργανισμό¹.

Η ζήτηση για τη βιοτεχνολογική αξιοποίηση των ξυλανολυτικών και λιγνινολυτικών ενζύμων των Βασιδιομυκήτων αυξάνεται συνεχώς λόγω της προοπτικής χρήσης τους σε μια ποικιλία βιομηχανικών διεργασιών. Αφενός, τα υδρολυτικά ένζυμα αποπολυμερισμού των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος έχουν κεντρίσει το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, καθώς τα προϊόντα τους μπορούν να αποτελέσουν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων και χημικών, ενώ μπορούν να αξιοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων και χαρτοπολτού². Από την άλλη μεριά, τα λιγνινολυτικά ένζυμα, πέρα από τις εφαρμογές στους τομείς των χημικών, των βιοκαυσίμων, των τροφίμων, της γεωργίας, του χαρτιού, της κλωστοϋφαντουργίας και των καλλυντικών, μπορούν να αξιοποιηθούν, επιπλέον, σε διεργασίες βιοεξυγίανσης μέσω της αποικοδόμησης διαφόρων ξενοβιοτικών ενώσεων, τοξικών ρύπων και χρωστικών³. Ειδικότερα, οι λακκάσες, οι οποίες εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες από τους Βασιδιομύκητες, αποτελούν ένζυμα μεγάλου βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος, καθώς λόγω της απαίτησης μόνο μοριακού οξυγόνου για τη δράση τους, αλλά και του μεγάλου εύρους υποστρωμάτων που οξειδώνουν, υπερέχουν των άλλων οξειδωτικών ενζύμων για την εφαρμογή στην αποσύνθεση χλωριωμένων φαινολικών ρύπων, συνθετικών βαφών, παρασιτοκτόνων και αντιβιοτικών⁴.

1.1 Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα

Η φυτική βιομάζα συνιστά την πιο άφθονη ανανεώσιμη πηγή άνθρακα στην οποία έχει πρόσβαση ο άνθρωπος⁵. Η λιγνινοκυτταρίνη, από την οποία αποτελείται η βιομάζα, είναι μια σύνθετη δομή που περιλαμβάνει τρία βασικά πολυμερικά συστατικά: την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη. Η αναλογία των συστατικών αυτών ποικίλει ανάλογα με το είδος του φυτικού οργανισμού, ενώ εξαρτάται, επίσης, από την ηλικία και το στάδιο ανάπτυξης αυτού⁶. Συνήθως, τα ποσοστά τους κυμαίνονται, από 40% έως 50% για την κυτταρίνη, από 20% έως 30% για την ημικυτταρίνη, και από 10% έως 25% για τη λιγνίνη⁷. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η μέση σύσταση διαφόρων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών.

Πίνακας 1. Μέση σύσταση διάφορων ειδών λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Λιγνινοκυτταρινούχος Βιομάζα	Λιγνίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Κυτταρίνη (%)	Αναφορά
Βαγάσση ζαχαροκάλαμου	20	25	42	⁸
Γλυκό σόργο	21	27	45	⁸
Σκληρό ξύλο	18-25	24-40	40-55	⁹
Μαλακό ξύλο	25-35	25-35	45-50	⁹
Στάχυ αραβοσίτου (Corn cob)	15	35	45	¹⁰
Στελέχη αραβοσίτου (Corn stover)	19	26	38	¹¹
Άχυρο ρυζιού	18	24	32	¹⁰
Άχυρο σίτου	16-21	26-32	29-35	¹²
Κέλυφος ξηρών καρπών	30-40	25-30	25-30	¹³
Εφημερίδα	18-30	25-40	40-55	¹⁴

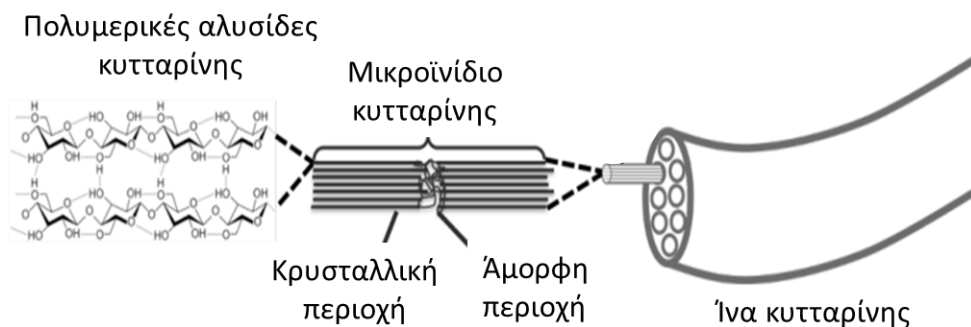
Οι φυτικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς προστασίας ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς και ασθένειες, με πιο σημαντικό την ύπαρξη του κυτταρικού τοιχώματος. Η δομή αυτή αποτελεί ασπίδα για το ευαίσθητο εσωτερικό των φυτών, προστατεύοντάς το από επιθετικούς μικροοργανισμούς. Το μέγεθος των πόρων του κυτταρικού τοιχώματος είναι τόσο μικρό που δεν επιτρέπει την είσοδο ακόμη και σε ιούς, επομένως οι μικροοργανισμοί αναγκάζονται να επιλέξουν διαφορετικές οδούς για την προσβολή των φυτών, είτε μέσω της διείσδυσης διαμέσου κενών του κυτταρικού τοιχώματος, είτε μέσω ενζυμικής αποικοδόμησης.

Δύο γειτονικά νεαρά φυτικά κύτταρα δημιουργούν, αρχικά, πρωτογενή τοιχώματα, που χαρακτηρίζονται από λεπτή δομή και ευλυγισία και αποτελούνται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Ο συγκολλητικός παράγοντας μεταξύ των κυττάρων αυτών είναι η πηκτίνη, η οποία αποτελεί μία κολλώδη ουσία που συγκρατεί τα γειτονικά κύτταρα στη θέση τους. Γενικά, ο ρόλος της κυτταρίνης είναι να παρέχει ακαμψία στους φυτικούς ιστούς, ενισχύοντας την αντοχή τους σε αξονικό εφελκυσμό. Για να επιτευχθεί αυτό, όμως, απαιτείται, επιπλέον, η συμβολή της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης, πολυμερή που δρουν ως συγκολλητικοί παράγοντες, ενισχύοντας την αντοχή των φυτών σε κάμψη, θλίψη και κρούση¹⁵.

1.1.1 Σύσταση

1.1.1.1 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί το κυριότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων, αποτελούμενη από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, ενωμένων μεταξύ τους με β -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Ως επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα θεωρείται ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη, ενώ ο βαθμός πολυμερισμού κυμαίνεται μεταξύ 7000 και 15000 μονάδων γλυκόζης, ανάλογα με το είδος της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας¹⁵. Οι αλυσίδες κυτταρίνης, ο αριθμός των οποίων έχει εύρος από 20 έως 300, ομαδοποιούνται, μέσω μορίων υδρογόνου και δεσμών Van der Waals, προς τον σχηματισμό διατεταγμένων δομών, που ονομάζονται μικροϊνίδια. Τα μικροϊνίδια αυτά έχουν διάμετρο 2-20 nm και μήκος 100 - 40 000 nm, ενώ κύρια λειτουργία τους είναι η διασφάλιση της ακαμψίας του κυτταρικού τοιχώματος¹⁵.



Εικόνα 1. Δομή της κυτταρίνης και οργάνωση σε μικροϊνίδια¹⁶

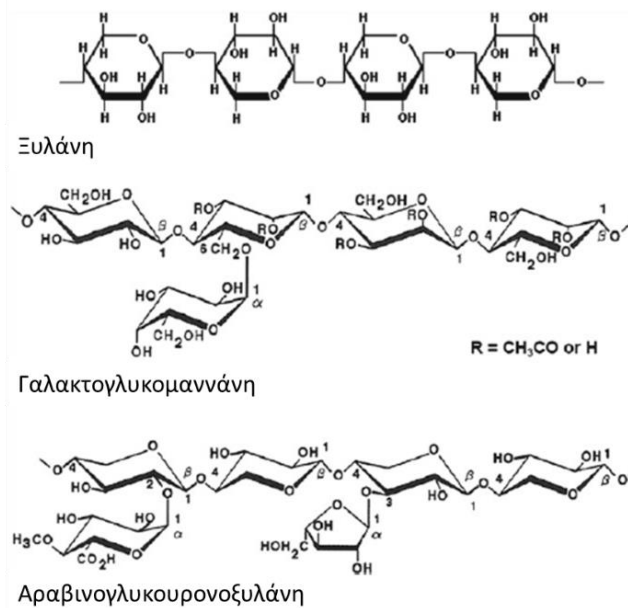
Η κυτταρίνη αποτελεί έναν αδιάλυτο πολυσακχαρίτη που σχηματίζει κρυσταλλικές περιοχές, με βαθμό κρυσταλλικότητας περίπου 70%, στις οποίες κατά διαστήματα παρεμβάλλονται άμορφα τμήματα. Διαθέτει τη δυνατότητα απεριόριστης διόγκωσης, ενώ εμφανίζει πλήρη διαλυτότητα σε οξέα, όπως το θειικό, το υδροχλωρικό και το φωσφορικό οξύ. Η διαμόρφωση των κρυσταλλικών περιοχών είναι αποτέλεσμα των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων της γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας κυτταρίνης, αλλά και των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα σε μόρια γλυκόζης γειτονικών αλυσίδων. Έτσι, οι αλυσίδες κυτταρίνης διευθετούνται σε παράλληλη επίπεδη διάταξη στον χώρο, ενώ παράλληλα σχηματίζονται επιπλέον δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα σε παράλληλα επίπεδα κυτταρίνης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπαγών κρυσταλλικών δομών. Από την άλλη, οι άμορφες περιοχές είναι πολύ υγροσκοπικές και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ενζυμική αποικοδόμηση^{6,15}.

1.1.1.2 Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη είναι το δεύτερο πιο άφθονο πολυμερές της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, με μορφή διακλαδισμένου πολυμερούς. Το πλέγμα αυτό μπορεί να αποτελείται από μονάδες πεντόζης, όπως D-ξυλόζη, L-αραβινόζη και L-ραμνόζη, μονάδες εξόζης, όπως D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη, αλλά και ουρονικά οξέα,

όπως D-γλυκουρονικό οξύ, D-4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ και D-γαλακτουρονικό οξύ. Η ραχοκοκαλιά των ημικυτταρινών μπορεί να είναι μία ομοπολυμερική ή ετεροπολυμερική αλυσίδα, με κοντές διακλαδώσεις, με κυριότερη την ύπαρξη β-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών, και περιστασιακά β-1,3 γλυκοζιτικών δεσμών, ενώ μπορεί να εμφανίσουν κάποιο βαθμό ακετυλίωσης. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, οι ημικυτταρίνες είναι άμορφες, με χαμηλό βαθμό πολυμερισμού, ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ 150 και 300, και χαρακτηρίζονται από έντονη υδροφιλία¹⁵.

Με βάση το κύριο μονομερές σάκχαρο που αποτελεί τη δομική τους μονάδα, οι ημικυτταρίνες διακρίνονται σε πέντε βασικές κατηγορίες: τις γλυκάνες, τις μαννάνες, τις αραβινάνες, τις γαλακτάνες και τις ξυλάνες. Ωστόσο, τονίζεται πως στη φύση οι ημικυτταρίνες παρουσιάζουν πολύπλοκη δομή και σπάνια αποτελούνται από ένα μόνο τύπο μονοσακχαρίτη. Έτσι, υπάρχει η γλυκουρονοξυλάνη, που περιέχει ξυλόζη και ουρονικό οξύ, η αραβινογλυκουρονοξυλάνη, που περιέχει αραβινόζη, ξυλόζη και ουρονικό οξύ, η γλυκομαννάνη, που περιέχει γλυκόζη και μαννόζη, η αραβινογαλακτάνη, που περιέχει αραβινόζη και γαλακτόζη, η ξυλογλυκάνη, που περιέχει ξυλόζη και γλυκόζη, και η γαλακτογλυκομαννάνη, που περιέχει γαλακτόζη, γλυκόζη και μαννόζη¹⁵. Ορισμένοι τύποι παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.



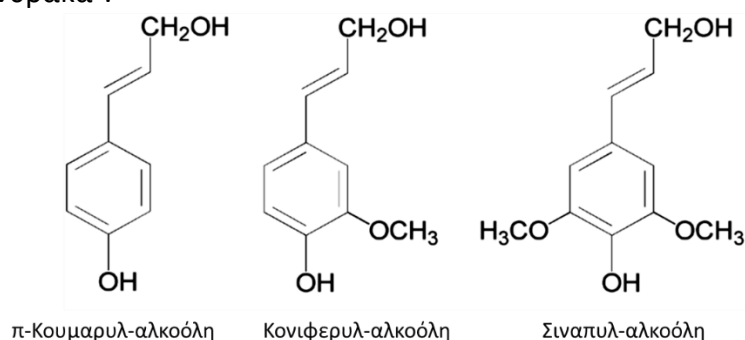
Εικόνα 2. Δομή της ξυλάνης, της γαλακτογλυκομαννάνης και της αραβινογλυκουρονοξυλάνης⁶

Από τις παραπάνω ημικυτταρίνες, η ξυλάνη αποτελεί το κυριότερο είδος. Οι ξυλάνες, με τη σειρά τους, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν, με βάση τη φύση των υποκαταστατών της κύριας αλυσίδας, σε πέντε ομάδες: τις ομοξυλάνες, τις αραβινοξυλάνες, τις γλυκουρονοξυλάνες, τις αραβινογλυκουρονοξυλάνες και τις γλυκουρονοαραβινοξυλάνες. Η οικογένεια των γραμμικών ομοξυλανών δεν περιλαμβάνει υποκαταστάτες στην κύρια αλυσίδα και συναντάται κυρίως στο κυτταρικό τοίχωμα φυκών και σπάνια σε ανώτερα χερσαία φυτά. Στην οικογένεια των αραβινοξυλανών η κύρια πολυμερική αλυσίδα αποτελείται από μονάδες β-1,4-D-ξυλοπυρανόζης και είναι υποκατεστημένη μόνο με ομάδες α-L-αραβινοφουρανόζης,

οι οποίες μπορεί να ενώνονται είτε με τον άνθρακα 3 κάποιων β-1,4-D-ξυλοπυρανοζών με α-1,3 γλυκοζιτικούς δεσμούς, είτε και με τον άνθρακα 2 και με τον 3 με α-1,2 και α-1,3 γλυκοζιτικούς, είτε συνδυαστικά. Οι αραβινοξυλάνες αποτελούν την κύρια ξυλάνη των δημητριακών. Οι ξυλάνες αυτές μπορεί να περιέχουν, επίσης, εστεροποιημένο οξικό οξύ και φαινολικά οξέα, όπως φερουλικό οξύ. Η οικογένεια των γλυκουρονοξυλανών φέρει ως υποκαταστάτες το α-D-γλυκουρονικό οξύ και το 4-O-μεθυλο-αιθερικό παράγωγό του, στη θέση 2 των ξυλοπυρανοζών της κεντρικής αλυσίδας. Οι ξυλάνες αυτές φέρουν, επίσης, ένα μεγάλο αριθμό υποκαταστάσεων από ακετυλομάδες στις θέσεις 2 και 3 του άνθρακα της ξυλόζης, προσδίδοντας την ικανότητα μερικής διάλυσης στο νερό, ενώ η ακριβής κατανομή των εστερικών δεσμών μεταξύ των θέσεων 2 και 3 είναι δύσκολο να προσδιοριστεί λόγω της μετακίνησης των οξικών ομάδων ανάμεσα στα υδροξύλια των θέσεων αυτών¹⁵. Η οικογένεια των γλυκουρονοαραβινοξυλανών, που συνήθως απαντάται στα κωνοφόρα, έχει παρόμοια δομή με την γλυκουρονοξυλάνη, αλλά ανά δέκα ξυλοπυρανόζες έχει μια υποκατάσταση α-L-αραβινοφουρανόζης μέσω α-1,3-γλυκοζιτικού δεσμού. Αυτές οι ξυλάνες δεν είναι ακετυλιωμένες και εξαιτίας της φουρανοζικής δομής τους, οι πλευρικές αλυσίδες της αραβινόζης υδρολύονται εύκολα από τα οξέα. Τέλος, η οικογένεια των αραβινογλυκουρονοξυλανών διαφέρει από την οικογένεια των γλυκουρονοαραβινοξυλανών μόνο στο γεγονός ότι οι αραβινοφουρανοζικοί υποκαταστάτες είναι σημαντικά περισσότεροι από τους υποκαταστάτες των ουρονικών οξέων. Αυτός ο τύπος της ξυλάνης απαντάται στα κωνοφόρα και στα μονοετή φυτά¹⁵.

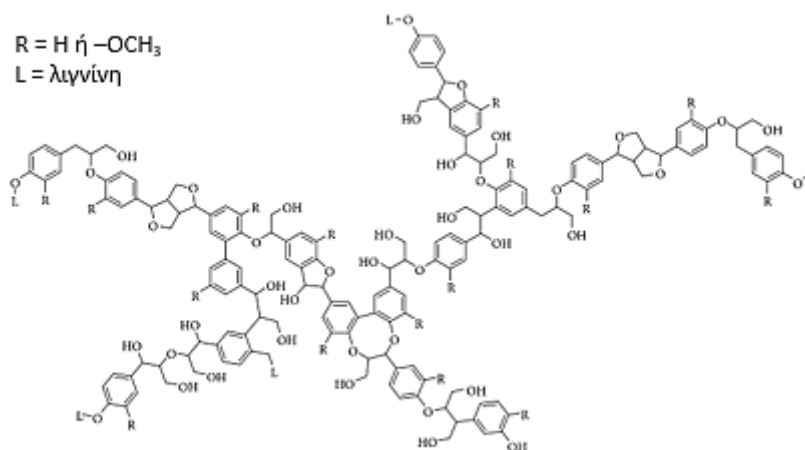
1.1.1.3 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι το τρίτο σε αφθονία πολυμερές που συναντάται στη φύση. Διαθέτει πολύπλοκη δομή τρισδιάστατου πολυμερούς με βασική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο⁶. Είναι άμορφη, υδρόφοβη, αδιάλυτη στο νερό, και παρουσιάζει πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού, που κυμαίνεται από 100.000 έως 300.000. Ρόλος της είναι να παρέχει στα φυτά αντίσταση ενάντια στη μικροβιακή προσβολή και στο οξειδωτικό στρες, προσδίδοντας τους στεγανότητα και υποστήριξη. Η διάγκωσή της είναι χαμηλή, ενώ υδρολύεται δύσκολα κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες¹⁵. Τρία είναι τα βασικά είδη φαινυλοπροπανίων που συναντώνται ως μονομερή της λιγνίνης, και τα οποία παρουσιάζονται στην Εικόνα 3. Τα φαινολικά αυτά μονομερή ενώνονται μεταξύ τους μέσω αιθερικών δεσμών και δεσμών άνθρακα – άνθρακα⁶.



Εικόνα 3. Τα φαινυλοπροπάνια της λιγνίνης¹⁷

Η λιγνίνη έχει αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός αποτρεπτικός παράγοντας της ενζυμικής υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας από τους μικροοργανισμούς λόγω της υδροφοβικότητας και της πολυπλοκότητάς της, συνιστώντας, έτσι, φυσικό εμπόδιο στη δράση των ενζύμων. Άλλες επιβλαβείς ιδιότητες της λιγνίνης περιλαμβάνουν τη μη ειδική προσρόφηση υδρολυτικών ενζύμων στην «κολλώδη» λιγνίνη, την παρεμπόδιση σύνδεσης των ενζύμων στα σύμπλοκα λιγνίνης-υδατανθράκων, καθώς και την τοξικότητα των παραγώγων λιγνίνης στους μικροοργανισμούς⁶.



Εικόνα 4. Δομή της λιγνίνης¹⁸

1.1.2 Πηγές λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά αποτελούν σήμερα έναν πολλά υποσχόμενο φυσικό και ανανεώσιμο πόρο, απαραίτητο για τη λειτουργία των σύγχρονων βιομηχανικών κοινωνιών. Καθημερινά, σημαντικός όγκος τέτοιων υλικών, όπως απόβλητα και παραπροϊόντα, παράγονται μέσω γεωργικών πρακτικών, κυρίως από διάφορες αγροτικές βιομηχανίες. Οι τεράστιες αυτές ποσότητες λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας μπορούν δυνητικά να μετατραπούν σε προϊόντα υψηλής αξίας, συμπεριλαμβανομένων των βιοκαυσίμων, των χημικών προστιθέμενης αξίας, αλλά και των φθηνών πηγών ενέργειας για μικροβιακή ζύμωση και παραγωγή ενζύμων¹⁹. Η αποτελεσματικότητα των τεχνολογιών μετατροπής εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα είδη βιομάζας που χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες, τα οποία διαφέρουν ως προς τη σύνθεση και την περιεκτικότητα σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη²⁰. Σημαντικό ρόλο στην απόδοση τεχνικών μετατροπής, όπως είναι η χημική, η βιοχημική και η υδροθερμική μετατροπή, διαδραματίζει, επίσης, η αποτελεσματικότητα της προκατεργασίας της βιομάζας, η οποία κρίνεται αναγκαία, ώστε σε επόμενο στάδιο να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός των επιμέρους συστατικών της πρώτης ύλης και διάσπαση αυτών σε συστατικά μικρότερου μοριακού βάρους, όπως ολιγοσακχαρίτες και μονοσακχαρίτες, τα οποία, στη συνέχεια, θα μπορέσουν να επεξεργαστούν και να αξιοποιηθούν²⁰.

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στις συγκεκριμένες διεργασίες περιλαμβάνουν ενεργειακές καλλιέργειες, όπως σόργο και μίσχανθο, αγροτικά υπολείμματα, όπως άχυρο σιταριού, πυρηνόξυλο και πίτυρο αραβοσίτου, δασική βιομάζα, όπως πριονίδια και κλαδέματα, καθώς και απόβλητα τροφικής προέλευσης²⁰. Συγκεκριμένα, στην παρούσα διπλωματική εργασία, για τη μελέτη του ενζυμικού προφίλ των Βασιδιομυκήτων, χρησιμοποιήθηκαν ως αγροτικό παραπροϊόν τα στελέχη αραβοσίτου (corn stover).

1.1.2.1 Στελέχη αραβοσίτου (Corn stover)

Ο αραβόσιτος (*Zea mays*) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αγροτικές καλλιέργειες και χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή ανθρώπινης τροφής, ζωοτροφών, καθώς και βιομηχανικών προϊόντων, όπως άμυλο καλαμποκιού, δημητριακά, γλυκαντικά, και αλκοόλ²¹. Κατά τη συγκομιδή και την επεξεργασία του αραβοσίτου, παράγονται μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων, όπως στελέχη, στάχυα, φύτρο αραβοσίτου και υγρά απόβλητα. Προσεγγιστικά, ένας σπόρος αραβοσίτου περιέχει 74% υδατάνθρακες, 9% πρωτεΐνη, 7% φυτικές ίνες, 4,7% λιπαρά και 10% νερό, αποτελώντας, έτσι, κύρια πηγή υδατανθράκων αλλά και μεταλλικών στοιχείων, όπως μαγνησίου, φωσφόρου και καλίου, βιταμινών και φυλλικού οξέος, προς κατανάλωση τόσο από ανθρώπους όσο και από ζώα²¹.

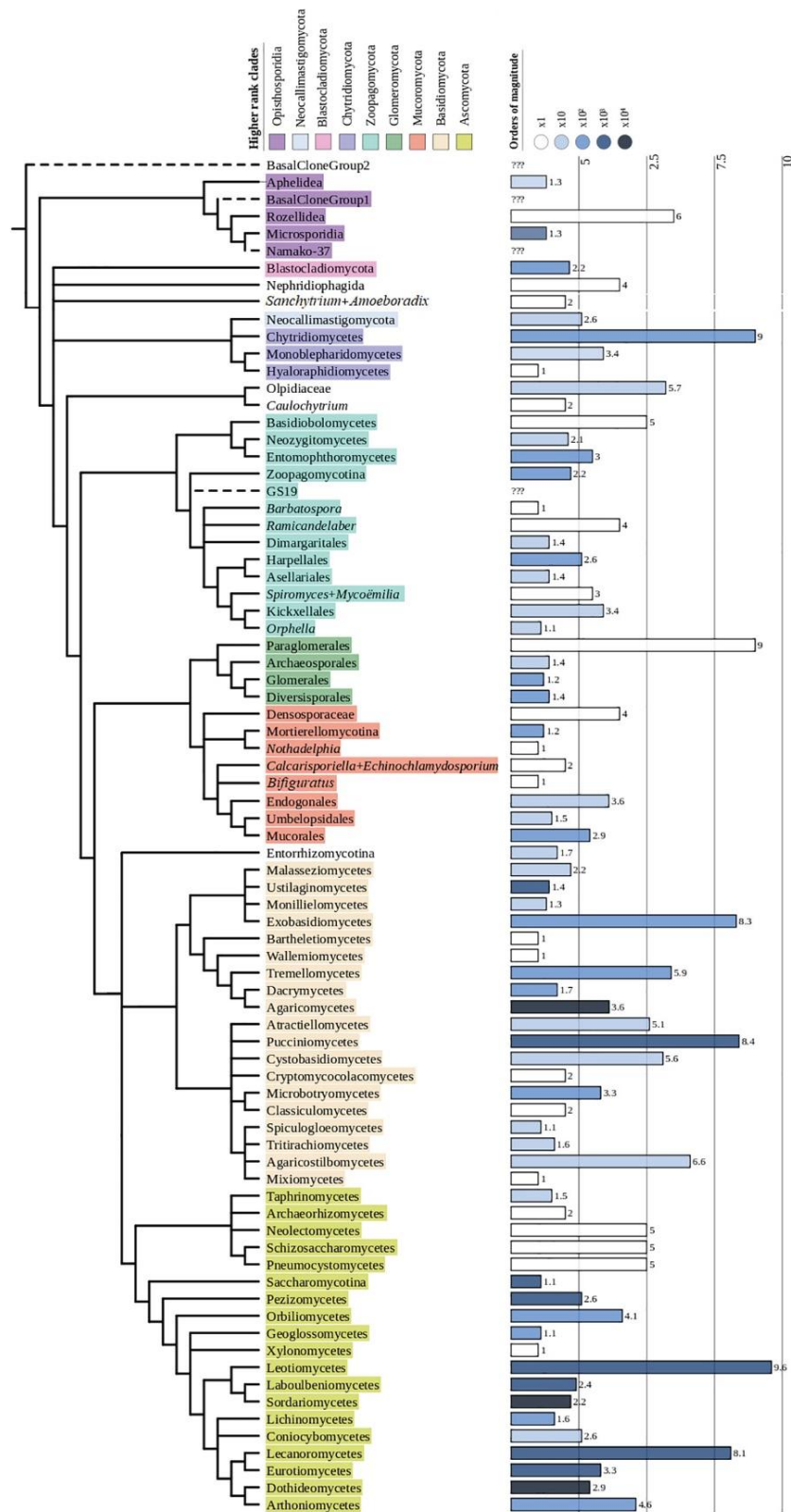
Τα στελέχη αραβοσίτου (corn stover) περιλαμβάνουν τα κοτσάνια, τα φύλλα και τα στάχυα, τα οποία παραμένουν στο χωράφι μετά τη συγκομιδή του αραβοσίτου. Η σύστασή τους στα δομικά συστατικά της λιγνινοκυτταρίνης είναι 35-38% w/w κυτταρίνη, 20-26% w/w ημικυτταρίνη και 12-19% w/w λιγνίνη²¹. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες, τα στελέχη αραβοσίτου θεωρούνται ως μία από τις βασικές λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοκαυσίμων²², καθώς και άλλων χημικών προστιθέμενης αξίας, όπως είναι το δικαρβοξυλικό οξύ (DCA), το προπιονικό οξύ (PA), το γαλακτικό οξύ, το λεβουλινικό οξύ, η ξυλιτόλη, η 5-(υδροξυμεθυλ) φουρφουράλη (HMF), η 1,4-πεντανοδιόλη, καθώς και διάφορα ένζυμα^{21,22}. Επιπλέον, τα στελέχη αραβοσίτου περιέχουν βιοδραστικές ενώσεις, ιδιαίτερα φαινολικές ενώσεις από τη λιγνίνη, η εκχύλιση των οποίων είναι σημαντική για την αύξηση της προστιθέμενης αξίας του υλικού αυτού, καθιστώντας το, έτσι, μία πιθανή πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών^{23,24}.

1.2 Μύκητες

Οι μύκητες, ενώ ιστορικά θεωρούνταν ότι ανήκουν στο φυτικό βασίλειο λόγω της μορφής τους και της έλλειψης προφανούς κινητικότητας, πλέον έχουν αναγνωριστεί ως ξεχωριστό βασίλειο²⁵. Η ταξινόμηση της συγκεκριμένης ομάδας έχει αποτελέσει αντικείμενο διαφωνιών για πολλούς επιστήμονες, ωστόσο, χάρη στην έλευση της γονιδιωματικής και της φυλογενωμικής, η κατάταξη των μικροοργανισμών σε φύλα αρχίζει να γίνεται πιο ξεκάθαρη²⁶. Οι περισσότεροι μύκητες είναι ευκαρυώτες, δεν έχουν μαστίγιο και σχηματίζουν νηματοειδείς υφές²⁷. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους είναι: i) η ύπαρξη κυτταρικού τοιχώματος β-γλυκάνης και χιτίνης, τουλάχιστον στα σπόριά τους, ii) είναι συνήθως μονοκύτταροι οργανισμοί ή αναπτύσσονται ως μυκήλια, iii) η βιοσύνθεση της λυσίνης μέσω της αμινο-αδιπικής οδού, και iv) η παρουσία δισκοειδών μιτοχονδριακών πτυχώσεων, με πολλές, ωστόσο, εξαιρέσεις²⁸.

Οι μύκητες μπορούν να εντοπιστούν παντού, από τη στρατόσφαιρα²⁹, έως τον βυθό της Μαύρης Θάλασσας³⁰, και από τους παγετώνες της Ανταρκτικής³¹ έως τις ερήμους της Λατινικής Αμερικής³². Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα, του αζώτου και του φωσφόρου, ενώ παρέχουν στα φυτά την απαραίτητη υποστήριξη για να αναπτυχθούν²⁷. Από την άλλη μεριά, ορισμένοι παθογόνοι μύκητες μπορούν να αποδεκατίσουν πληθυσμούς ζώων και φυτών, απειλώντας, έτσι, προμήθειες τροφίμων, αλλά και ωθώντας ορισμένα είδη στον αφανισμό. Οι μεταβολικές ιδιαιτερότητες των μικροοργανισμών αυτών δεν έμειναν ανεκμετάλλευτες από τον άνθρωπο, οδηγώντας σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως η ζύμωση τροφίμων και ποτών, και η αξιοποίηση ενζύμων και μεταβολικών προϊόντων, τόσο στη Φαρμακευτική όσο και στη Βιομηχανία γενικότερα²⁶.

Σύμφωνα με τα πιο σύγχρονα δεδομένα, οι μύκητες κατατάσσονται σε 9 βασικά φύλα, όπως παρουσιάζονται από το φυλογενετικό δένδρο στην Εικόνα 5. Στην πρώτη στήλη, τα διαφορετικά χρώματα αντιστοιχούν στα διαφορετικά φύλα των μυκήτων, ενώ στη δεύτερη στήλη παρουσιάζεται ο αριθμός των γνωστών ειδών από κάθε ομάδα.



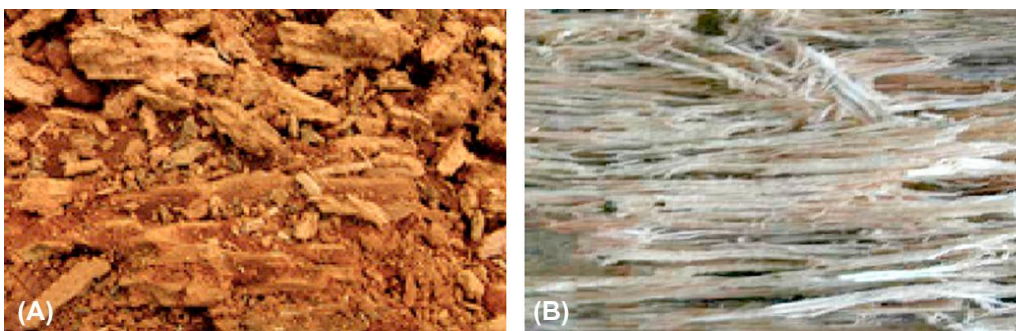
Εικόνα 5. Το φυλογενετικό δένδρο των μυκήτων²⁶

Είναι φανερό πως στους Βασιδιομύκητες περιλαμβάνεται μεγάλο ποσοστό των ειδών της μυκητιακής βιοποικιλότητας, αποτελώντας το δεύτερο πιο πλούσιο σε είδη φύλο, το οποίο, μάλιστα, περιλαμβάνει τα πολυπλοκότερα στελέχη ως προς τον κυτταρικό κύκλο και τη δομή²⁶.

1.2.1 Βασιδιομύκητες

Οι Βασιδιομύκητες συχνά αναφέρονται ως «μύκητες-ρόπαλα» επειδή τα σπόριά τους συνδέονται με μία ροπαλόμορφη δομή, που ονομάζεται βασίδιο. Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται τα βρώσιμα και φαρμακευτικά μανιτάρια, παθογόνα φυτών και ζώων, συμβιωτικά και ενδόφυτα σε λειχήνες, μυκόρριζες φυτικών ριζών και σαπρόφυτα¹. Η τελευταία κατηγορία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα, ειδικότερα σε δασικά οικοσυστήματα, συμβάλλοντας στη βιοαποικοδόμηση υπέρογκων ποσοτήτων λιγνινοκυτταρίνης από τα νεκρά δέντρα, μέσω λευκής ή καστανής σήψης³³. Οι σηπτικοί μύκητες μπορούν να εγκατασταθούν σε ποικίλους τύπους ξύλου, διαφόρων σταδίων σήψης, με το κάθε στέλεχος, ωστόσο, να παρουσιάζει συγκεκριμένες προτιμήσεις ως προς τον ξενιστή του¹. Επιπρόσθετα, οι μύκητες αυτοί προσαρμόζονται ώστε να αντιστέκονται στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών καθώς και σε αντιμυκητιακές ουσίες, όπως τα φαινολικά, οι τανίνες και τα αλκαλοειδή, ενώ διαθέτουν την ικανότητα να προσαρμόζονται σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες χωρίς να χάνουν τη λιγνινολυτική τους ικανότητα³.

Ανάλογα με την ικανότητα αποικοδόμησης της λιγνίνης παρουσία ή μη κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, οι Βασιδιομύκητες διακρίνονται σε λευκής και καστανής σήψης¹. Ο όρος «λευκή σήψη» αναφέρεται στη λευκή όψη που αποκτά του ξύλο που έχει υποστεί αποικοδόμηση από τη συγκεκριμένη κατηγορία μικροοργανισμών (Εικόνα 6). Κοινό χαρακτηριστικών των μυκήτων λευκής σήψης αποτελεί η ικανότητα αποικοδόμησης και των τριών συστατικών του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος¹. Η αποσύνθεση της λιγνινοκυτταρίνης επιτυγχάνεται με μια σειρά ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιδράσεων. Από την άλλη μεριά, ο όρος «καστανή σήψη» αναφέρεται στο καστανό χρώμα του αποσυντιθέμενου ξύλου, το οποίο εμφανίζει ρωγμές ως αποτέλεσμα του άνισου μοτίβου της αποσύνθεσης (Εικόνα 6). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται καθώς οι μύκητες αυτοί αποικοδομούν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, αφήνοντας τη λιγνίνη σχεδόν άθικτη ως μία καστανή, χημικά τροποποιημένη πολυμερική δομή¹.



Εικόνα 6. Αποσύνθεση ξύλου από μύκητες καστανής σήψης (A) και μύκητες λευκής σήψης (B)

Παρακάτω, αναφέρονται τα τρία γένη Βασιδιομυκήτων που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, δίνοντας έμφαση στις γνωστές ή πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές τους.

1.2.1.1 Το γένος *Pleurotus*

Το γένος *Pleurotus* αποτελεί μία ομάδα βρώσιμων λιγνινολυτικών μανιταριών με φαρμακευτικές ιδιότητες και σημαντικές βιοτεχνολογικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές. Διατροφικά, χαρακτηρίζονται από την ιδιαίτερη γεύση και τις αρωματικές τους ιδιότητες, ενώ είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, φυτικές ίνες, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Ως προς τη βιοτεχνολογική τους αξιοποίηση, οι Βασιδιομύκητες του συγκεκριμένου γένους αποτελούν πολλά υποσχόμενους φαρμακευτικούς παράγοντες, ενώ χάρη στο λιγνινολυτικό ενζυμικό τους σύστημα μπορούν να αξιοποιηθούν σε εφαρμογές, όπως η βιομετατροπή αγροτικών υπολειμμάτων σε προϊόντα υψηλής αξίας και η βιοαποικοδόμηση οργανικών ρύπων, ξενοβιοτικών και βιομηχανικών αποβλήτων³⁴.

Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* εμφανίζουν μεγάλη ευκολία ως προς την καλλιέργειά τους. Στη φύση συναντώνται, κυρίως, σε κορμούς δένδρων, ενώ για την καλλιέργειά τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα εύρος λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων, όπως ροκανίδια, άχυρο ρυζιού, αραβόσιτο, μίσχους βαμβακιού και άλλα αγροτικά υπολείμματα, ορισμένα από τα οποία μπορούν να ανακυκλωθούν και να αναβαθμιστούν³⁴. Η δυνατότητα χρήσης των συγκεκριμένων υποστρωμάτων έγκειται στην ικανότητα του *Pleurotus* να εκκρίνει ένζυμα, όπως υπεροξειδάσες, κυτταρινάσες, λακκάσες, ημικυτταρινάσες και ξυλανάσες, οδηγώντας στην αποτελεσματική αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης χωρίς την απαίτηση κάποιας χημικής ή βιολογικής προκατεργασίας³⁴.

Μία από τις πιο γνωστές εφαρμογές των μανιταριών του γένους *Pleurotus* είναι εκείνη στον τομέα της υγείας³⁴. Τα μανιτάρια αυτά χαρακτηρίζονται ως «φαρμακευτικά», αποτελώντας πηγή κυτταρικών συστατικών και δευτερογενών μεταβολιτών με αντιμικροβιακές, αντι-ιικές, αντικαρκινικές, υποτασικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες. Οι ουσίες αυτές φαίνεται να επιδρούν θετικά στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, με αποτέλεσμα να μπορούν να αξιοποιηθούν για την καταπολέμηση διάφορων ασθενειών³⁵. Ειδικότερα, ως προς την αντικαρκινική τους δράση, έχουν απομονωθεί και χαρακτηρισθεί πολλά βιοενεργά μόρια από μανιτάρια *Pleurotus*, όπως πολυσακχαρίτες, με κυριότερες τις β-γλυκάνες, λεκτίνες, τερπενοειδή, στεροειδή και νουκλεϊκά οξέα^{36,37}.

Μία άλλη εφαρμογή των μανιταριών αυτών αφορά στην αναβάθμιση των γεωργικών αποβλήτων για την αξιοποίησή τους ως ζωοτροφές. Τα μηρυκαστικά αντιμετωπίζουν μεγάλη δυσκολία στην πέψη ακατέργαστων αγροτικών υπολειμμάτων λόγω της ύπαρξης της λιγνίνης, η οποία συνιστά φυσικό και χημικό φραγμό, εμποδίζοντας τα υδρολυτικά ένζυμα να δράσουν. Ωστόσο, η χρήση Βασιδιομυκήτων λευκής σήψης μπορεί να βελτιώσει την πεπτικότητα των λιγνινολυτικών αυτών υποστρωμάτων, μέσω της αποικοδόμησης της λιγνίνης και της απελευθέρωσης της κυτταρίνης, ενώ, επιπλέον, η βιολογική αυτή κατεργασία μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της διατροφικής αξίας αλλά και του πρωτεϊνικού περιεχομένου τους³⁴.

Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* αποτελούν, επίσης, πολλά υποσχόμενους υποψηφίους για εφαρμογές βιοεξυγίανσης³⁴. Ο όρος αυτός αναφέρεται στη

διαδικασία βιολογικής μετατροπής επικίνδυνων αποβλήτων σε αβλαβείς ενώσεις ή σε μείωση των επιπέδων τους κάτω από τα ανώτερα επιτρεπόμενα όρια. Είναι φανερό πως συγκριτικά με τις παραδοσιακές φυσικές και χημικές μεθόδους εξυγίανσης, η βιοεξυγίανση παρουσιάζει σημαντικά προτερήματα, όπως είναι το χαμηλό κόστος, η εύκολη πρόσβαση στα υλικά, αλλά και η αποφυγή δευτερογενούς μόλυνσης. Σε αυτές τις εφαρμογές περιλαμβάνεται η αποσύνθεση των βιομηχανικών βαφών, φαινολικών ρύπων και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs), καθώς και άλλων ρύπων του εδάφους. Οι PAHs αποτελούν ρύπους με μεταλλαξογόνο και καρκινική δράση, αποτελούμενοι από τρεις ή περισσότερους βενζοϊκούς δακτυλίους, των οποίων η αποσύνθεση και αποτοξικοποίηση περιλαμβάνει οξειδωτικά ένζυμα³⁸. Με δεδομένο ότι η λιγνίνη αποτελεί μία φυσική πολυαρωματική ένωση που διασπάται από τα εξωκυτταρικά οξειδωτικά ένζυμα των Βασιδιομυκήτων, έχει διερευνηθεί η εφαρμογή του λιγνινολυτικού συστήματος των μυκήτων του γένους *Pleurotus* για την αποικοδόμηση των PAHs^{39,40}. Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν τη δυνατότητα μεταβολισμού της αρχικής δομής των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, σπάζοντας τους αρωματικούς δακτυλίους, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενώσεων διαθέσιμων προς περαιτέρω επεξεργασία, μειώνοντας, έτσι, τη βιοτοξικότητα των αρχικών ρύπων³⁴.



Εικόνα 7. *Pleurotus citrinopileatus* (<https://eol.org/pages/1016971>)



Εικόνα 8. Νηματοειδείς υφές *P. citrinopileatus* (www.mycobank.org/MB/303973)

1.2.1.2 Το γένος *Ganoderma*

Το γένος *Ganoderma* αποτελεί κατηγορία μανιταριών γνωστών για τη μορφή κρούστας που εμφανίζουν στο ανώτατο τμήμα του σώματός τους, το οποίο σε πολλές περιπτώσεις παρουσιάζει υφή βερνικιού⁴¹. Όλα τα είδη του συγκεκριμένου γένους προκαλούν λευκή σήψη, αποικοδομώντας το ξυλώδες κυτταρικό τοίχωμα με διάφορους τρόπους, είτε με επιλεκτική διάσπαση της λιγνίνης είτε με ταυτόχρονη σήψη. Σε περιοχές με εύκρατο κλίμα, η αποσύνθεση που προκαλείται από τα μανιτάρια του γένους αυτού περιορίζεται στις ρίζες και στο κατώτερο τμήμα των δένδρων, ενώ η παρουσία τους ανιχνεύεται εύκολα χάρη στα πολυετή σώματά τους, με εξαίρεση ορισμένα στελέχη, όπως το *G. resinaceum*, των οποίων τα σώματα είναι ετήσια⁴¹. Χάρη στα λιγνινολυτικά ένζυμα που παράγουν, τα μανιτάρια αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν σε διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Έχοντας τη δυνατότητα απομάκρυνσης της λιγνίνης από τη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα, τα μανιτάρια του γένους *Ganoderma*, σε αντιστοιχία με εκείνα του γένους *Pleurotus*, μπορούν να αξιοποιηθούν, τόσο στην αναβάθμιση των αγροτικών υπολειμμάτων για τη χρήση τους ως ζωοτροφές, όσο και στην βιοεξυγίανση, στον αποχρωματισμό των βαφών, αλλά και στη βιομηχανία χαρτιού⁴².

Επιπλέον, οι συγκεκριμένοι μύκητες χρησιμοποιούνται εδώ και εκατοντάδες χρόνια στην παραδοσιακή ιατρική της Κίνας⁴³. Ευεργετικές ιδιότητές τους έχουν παρατηρηθεί σε πληθώρα νοσημάτων, μεταξύ των οποίων παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος και της κυκλοφορίας του αίματος, ενώ φαίνεται να ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα και να εμφανίζουν αντιγηραντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες⁴³. Ειδικότερα, βιοενεργά μόρια από τα μανιτάρια αυτά παρουσιάζουν νευροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, με προοπτική χρήσης τους για την καταπολέμηση της αϋπνίας, της επιληψίας και της κατάθλιψης⁴⁴.



Εικόνα 9. *Ganoderma resinaceum* (www.mycobank.org/MB/123196)



Εικόνα 10. Νηματοειδείς υφές *G. resinaceum* (www.mycobank.org/MB/123196)

1.2.1.3 Το γένος *Abortiporus*

Το γένος *Abortiporus* αποτελεί μία ομάδα μυκήτων λευκής σήψης, η οποία περιλαμβάνει τρία είδη, με επικρατέστερο το *Abortiporus biennis*. Ο μικροοργανισμός αυτός αναφέρεται ως ένα σπάνιο βρώσιμο μανιτάρι με φαρμακευτικές ιδιότητες, το οποίο συναντάται κυρίως στην Ασία, την Αμερική και τη Δυτική Ευρώπη⁴⁵. Το συγκεκριμένο είδος είναι συνήθως παρασιτικό σε διάφορους τύπους πλατύφυλλων δένδρων, ενώ αναπτύσσεται κυρίως στις ρίζες ή στα πεσμένα φύλλα φυλλοβόλων δένδρων κατά τους φθινοπωρινούς μήνες. Χρησιμοποιείται εδώ

και εκατοντάδες χρόνια ως φαρμακευτικό μέσο χάρη στις βιολογικές του ιδιότητες, ενώ θεωρείται καλός παραγωγός λακκασών⁴⁶. Επιπλέον, χάρη στην παραγωγή οξειδίων του οξαλικού οξέος, το *A. biennis* διαθέτει την ικανότητα διαλυτοποίησης τοξικών μεταλλικών οξειδίων, όπως Cu_2O και Al_2O_3 ⁴⁷. Σε σύγκριση με τα δύο προαναφερόμενα γένη, το *Abortiporus* αποτελεί εκείνο που έχει μελετηθεί λιγότερο ως προς το ενζυμικό του σύστημα. Για τον λόγο αυτό, οι εφαρμογές του μέχρι σήμερα φαίνονται να είναι περιορισμένες, ωστόσο παρουσιάζει προοπτικές τόσο για αξιοποίηση στον τομέα της βιοτεχνολογίας, όσο και στον τομέα της θεραπευτικής ιατρικής.



Εικόνα 11. *Abortiporus biennis* (www.mycobank.org/MB/283905)



Εικόνα 12. Νηματοειδείς υφές του *A. biennis*. Χαρακτηριστικό γνώρισμα του συγκεκριμένου στελέχους αποτελεί η παραγωγή μεταβολιτών ερυθρού χρώματος, όπως φαίνεται στο τρυβλίο που βρίσκεται δεξιά. (www.mycobank.org/MB/283905)

1.3 Ενζυμικό σύστημα αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρίνης από Βασιδιομύκητες

Δεδομένης της πολύπλοκης δομής ετεροπολυμερικής μήτρας που σχηματίζει η λιγνινοκυτταρίνη, η αποικοδόμησή της απαιτεί τη συνεργιστική δράση μίας πληθώρας οξειδωτικών, υδρολυτικών και μη υδρολυτικών ενζύμων. Στη συνέχεια, περιγράφεται το ενζυμικό αυτό σύστημα, καθώς και οι πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές των λιγνινολυτικών ενζύμων των Βασιδιομυκήτων.

1.3.1 Ενζυμικό σύστημα αποικοδόμησης κυτταρίνης και ημικυτταρίνης

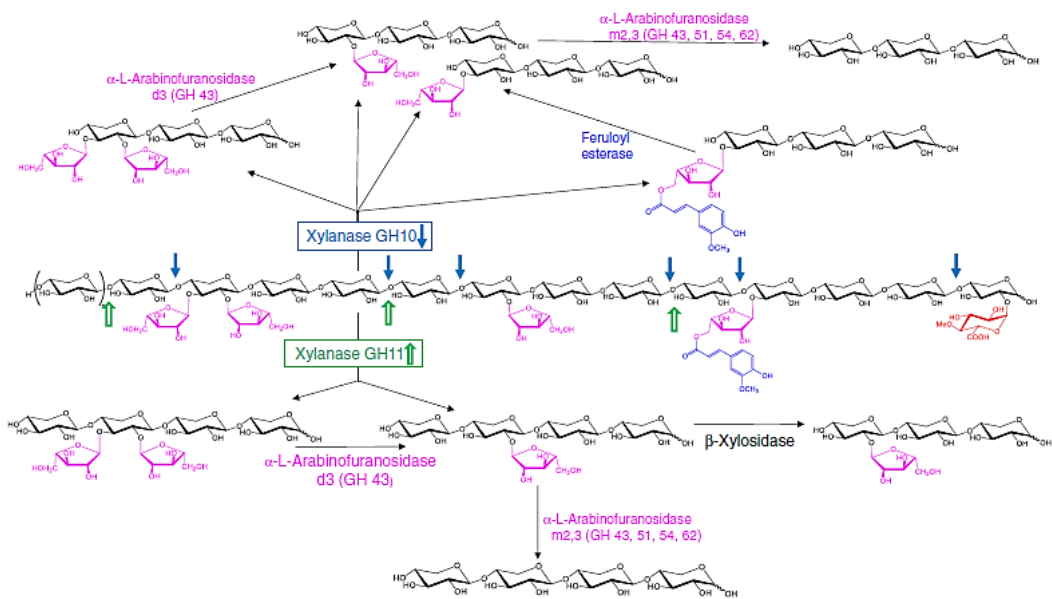
Η κυτταρίνη, λόγω της ιδιαίτερης δομής της, παρουσιάζει ισχυρή ανθεκτικότητα στην αποικοδόμηση, απαιτώντας τη συνδυαστική δράση πολλών και διαφορετικών ενζυμικών ενεργοτήτων. Οι άμορφες περιοχές των ινιδίων κυτταρίνης, έχοντας ασθενέστερη οργάνωση, είναι περισσότερο προσβάσιμες στα ένζυμα κατά την ενζυμική επίθεση, σε αντίθεση με την άκαμπτη δομή των κρυσταλλικών περιοχών. Τα παράλληλα επίπεδα αλυσίδων κυτταρίνης και οι διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται συμβάλλουν στη μείωση της διαλυτότητας καθώς και στη χαμηλή αντιδραστικότητα της κυτταρίνης¹.

Το κλασικό μοντέλο αποικοδόμησης της κυτταρίνης σε γλυκόζη περιλαμβάνει την συνδυαστική δράση των ενδοκυτταρινασών (EC 3.2.1.4), των εξωκυτταρινασών (EC 3.2.1.91), των γλυκανο-υδρολάσεων (EC 3.2.1.74) και των β-γλυκοζιδασών (EC 3.2.1.21)¹. Οι ενδοκυτταρινάσες υδρολύουν τους εσωτερικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς με τυχαίο τρόπο, με αποτέλεσμα την ταχεία μείωση του μήκους του πολυμερούς και τη σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων. Από την άλλη, οι εξωκυτταρινάσες υδρολύουν τις αλυσίδες της κυτταρίνης αφαιρώντας κυρίως κελλοβιόζες είτε από τα αναγωγικά είτε από τα μη αναγωγικά άκρα, οδηγώντας, έτσι, σε ταχεία απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων, έχοντας, όμως, μικρή επίδραση στη μείωση του μήκους του πολυμερούς. Τα δύο αυτά υδρολυτικά ένζυμα δρουν συνεργιστικά στην κυτταρίνη προς την παραγωγή κυτταρινο-ολιγοσακχαριτών και κελλοβιόζης, μόρια τα οποία, στη συνέχεια, διασπώνται μέσω της δράσης της β-γλυκοζιδάσης σε γλυκόζη¹. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί η παραγωγή μίας νέας κατηγορίας ενζύμων με οξειδωτική δράση, γνωστών ως μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs, EC 1.14.99.54). Τα συγκεκριμένα ένζυμα διασπών τις αλυσίδες κυτταρίνης, μέσω ενός οξειδωτικού μηχανισμού, δρώντας συνεργιστικά με τα υδρολυτικά ένζυμα⁴⁸.

Η υδρόλυση των ημικυτταρινών περιλαμβάνει ένζυμα όπως υδρολάσες γλυκοζιτών, εστεράσες υδατανθράκων, λυάσες πολυσακχαριτών και ενδοημικυτταρινάσες. Τα ένζυμα αυτά δρουν ομαδικά υδρολύοντας γλυκοζιτικούς και εστερικούς δεσμούς, αφαιρώντας πλευρικές αλυσίδες και υποκαταστάτες. Αυτές οι κατηγορίες ενζύμων περιλαμβάνουν τις ενδο-1,4-β-ξυλανάσες (EC 3.2.1.8), τη β-ξυλοσιδάση (EC 3.2.1.37), τη β-μαννανάση (EC 3.2.1.78), τη β-μαννανοσιδάση, (EC 3.2.1.25), τις α-γλυκουρονοζιδάσες (EC 3.2.1.1), τις α-L-αραβινοφουρανοσιδάσες (EC 3.2.1.55), τις

εστεράσες του οξικού οξέος (EC 3.1.1.72) και τις εστεράσες του φερουλικού οξέος (EC 3.1.1.73), υποκατηγορία των καρβοξυλ-εστερασών (EC 3.1.1.1)¹.

Η δράση ορισμένων από των παραπάνω ενζύμων παρουσιάζεται στην Εικόνα 13.



Εικόνα 13. Ενζυμική αποικοδόμηση αραβινογλυκουρονοξυλάνης⁴⁹

Οι ξυλανάσες μέχρι σήμερα αποτελούν μέλη των οικογενειών 5, 7, 8, 10, 11, 30 και 43 της ευρύτερης ομάδας των γλυκοζυλ-υδρολασών (GH), σύμφωνα με την τράπεζα δεδομένων CAZY (<http://www.cazy.org/>). Η βιοαποικοδόμηση της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης επιτυγχάνεται κυρίως με τη δράση των ενδοξυλανασών και της β-ξυλοζιδάσης¹⁵. Οι πρώτες διαθέτουν την ικανότητα διάσπασης την αλυσίδα της ξυλάνης σε μικρότερους ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι, με τη σειρά τους, μπορούν να αποικοδομηθούν περαιτέρω σε ξυλόζη από τις β-ξυλοζιδάσες. Οι δύο κυριότερες οικογένειες ξυλανασών είναι οι 10 και 11. Οι GH10 έχουν την ικανότητα να προσβάλλουν την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης και τους δεσμούς που βρίσκονται πιο κοντά σε υποκατεστημένα μόρια, ενώ οι GH11 παρεμποδίζονται από την ύπαρξη πλευρικού υποκατάστατη. Ως εκ τούτου, η δράση των ξυλανασών της οικογένειας 10 οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων με μικρότερο μοριακό βάρος συγκριτικά με τα προϊόντα των ξυλανασών της οικογένειας 11¹⁵.

Ως προς τη δράση των υπόλοιπων ξυλανολυτικών ενζύμων, οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες καταλύουν την υδρόλυση πλευρικών μονάδων L-αραβινόζης, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με α-L-1,2-, α-L-1,3- και α-L-1,5- δεσμούς με μονάδες ξυλοπυρανόζης, ενώ οι α-γλυκουρονοζιδάσες απομακρύνουν τις μονάδες του γλυκουρονικού οξέος και των αντίστοιχων 4-μεθυλοαιθέρων τους από την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης. Οι εστεράσες του οξικού οξέος, με τη σειρά τους, απελευθερώνουν ακετυλο-ομάδες, ενώ οι εστεράσες του φερουλικού οξέος έχουν την ιδιότητα να υδρολύουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ υδροξυ-κινναμικών οξέων (φερουλικό ή π-κουμαρικό οξύ) ή διϋδρο-διμερών μορφών του φερουλικού οξέος και των αλυσίδων της ξυλάνης¹⁵.

Διάφοροι τύποι συνεργιτισμού μεταξύ των ξυλανολυτικών ενζύμων έχουν ανακαλυφθεί, οι οποίοι μπορεί να καταταχθούν σε δύο ομάδες: τον ομοσυνεργιτισμό, μεταξύ δύο ενζύμων που δρουν στην κεντρική αλυσίδα της ξυλάνης ή δύο ενζύμων που δρουν στις πλευρικές ομάδες, και τον ετεροσυνεργιτισμό, μεταξύ ενός ενζύμου που δρα στην κεντρική αλυσίδα και ενός βοηθητικού⁵⁰. Ο πιο χαρακτηριστικός τύπος συνεργιτισμού περιλαμβάνει τη συνεργασία μεταξύ των ενζύμων που διασπούν την κύρια αλυσίδα της ημικυτταρίνης και των ενζύμων που απελευθερώνουν τους υποκαταστάτες πλευρικών αλυσίδων, όπως μονάδες φερουλικού ή οξικού οξέος και L-αραβινόζης. Η καταλυτική δράση της ξυλανάσης απελευθερώνει υποκατεστημένους ξυλοολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι διαχέονται ευκολότερα και αποτελούν πιο ευνοϊκά υποστρώματα για τα βοηθητικά ένζυμα, ενώ, αντίστοιχα, η απομάκρυνση πλευρικών αλυσίδων από τα βοηθητικά ένζυμα, δημιουργεί νέες θέσεις στην κύρια αλυσίδα και βοηθά την πρόσδεση της ξυλανάσης. Έτσι, τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν συνεργιστική δράση μεταξύ τους, υποβοηθώντας, παράλληλα, τη δράση των κυτταρινασών¹⁵.

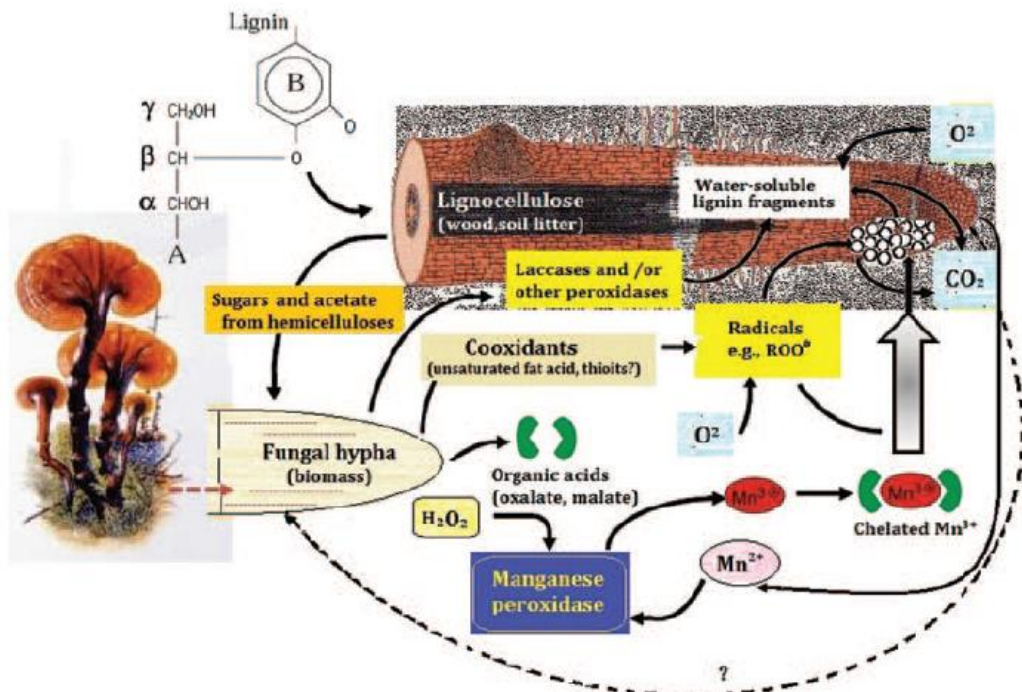
1.3.1.1 Εφαρμογές

Τα ξυλανολυτικά ένζυμα παρουσιάζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον ως προς την αξιοποίησή τους σε ορισμένες βιομηχανικές εφαρμογές, με στόχο την αύξηση της παραγωγικότητας με ταυτόχρονη μείωση του κόστους⁵¹. Τέτοιες εφαρμογές εντοπίζονται κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων και χαρτοπολτού, ενώ μπορεί να αφορούν και την παραγωγή υγρών και αέριων καυσίμων και διαλυτών. Πιο συγκεκριμένα, μία από τις κυριότερες εφαρμογές των ξυλανασών αφορά την προ-λεύκανση των χαρτοπολτών, η οποία ενισχύεται ιδιαίτερα όταν τα ένζυμα αυτά συνδυαστούν με βοηθητικά ένζυμα των πλευρικών ομάδων της ξυλάνης⁵². Επιπλέον, οι ξυλανάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μετατροπή της ξυλάνης σε ξυλόζη στα λύματα των αγροτικών βιομηχανιών⁵³, όπως, επίσης, και για την προκατεργασία λιγνινοκυτταρινούχων υλών που προορίζονται για ζωοτροφές, βελτιώνοντας την πεπτικότητα τους από τα μηρυκαστικά. Σχετικά με τη βιομηχανία τροφίμων, οι ξυλανάσες, σε συνδυαστική χρήση με κυτταρινάσες και πηκτινάσες, μπορούν να αξιοποιηθούν για τη διαύγαση του μούστου και των φυσικών χυμών, ενώ οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες και οι β-D-γλυκοκυρανοζιδάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την βελτίωση του αρώματος του κρασιού και των χυμών⁵¹. Τέλος, η συνεργιστική δράση των ξυλανασών με άλλα ξυλανολυτικά και λιγνινολυτικά ένζυμα, όπως οι μαννάσες, οι ξυλοζιδάσες, οι λακκάσες και οι γλυκοζιδάσες, μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως βιοαιθανόλη, με πρώτη ύλη τη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα⁵¹. Η βιολογική διαδικασία παραγωγής καυσίμου αιθανόλης απαιτεί αρχικά την απομάκρυνση της λιγνίνης, ώστε να ακολουθήσει η απελευθέρωση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και ο αποπολυμερισμός των υδατανθρακικών αυτών πολυμερών για την παραγωγή ελεύθερων σακχάρων και, τελικά, τη ζύμωση των πεντοζών και των εξοζών προς παραγωγή αιθανόλης⁵⁴.

1.3.2 Ενζυμικό σύστημα αποικοδόμησης λιγνίνης

Η αποικοδόμηση της λιγνίνης από Βασιδιομύκητες λευκής σήψης περιλαμβάνει ένα σύνολο ενζύμων που ονομάζονται ένζυμα τροποποίησης λιγνίνης (Lignin Modifying

Enzymes, LMEs)¹. Τα περισσότερα LME εκκρίνονται ως πολλαπλά ισόμορφα από πολλά διαφορετικά είδη μυκήτων λευκής σήψης και υπό διαφορετικές συνθήκες, και περιλαμβάνουν τις λακκάσες (EC 1.10.3.2) και τρία είδη υπεροξειδασών: τις υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP, EC 1.11.1.14), τις υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP, EC 1.11.1.13), και τις ευέλικτες υπεροξειδάσες (VP, EC 1.11.1.16)¹. Τα ένζυμα αυτά εκκρίνονται από τους μύκητες σε ποικίλες αναλογίες και ποσότητες, με συνηθέστερες τις λακκάσες και τις MnP, και σπανιότερα τις LiP και VP. Πέρα, όμως, από τις υπεροξειδάσες και τις λακκάσες, οι μύκητες παράγουν βοηθητικά ένζυμα, τα οποία δεν μπορούν να αποικοδομήσουν τη λιγνίνη από μόνα τους, αλλά είναι απαραίτητα για την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής. Τέτοια ένζυμα είναι η οξειδάση των αρυλ-αλκοολών (AAO, EC 1.1.3.7), η γλυοξαλική οξειδάση (GLOX, EC 1.2.3.5), η αναγωγή της κινόνης (QR, EC 1.1.5.1), η αφυδρογονάση της κυτταρίνης (CDH, EC 1.1.99.18) και η οξειδάση της μεθανόλης (EC 1.1.3.13)³.



Εικόνα 14. Μοντέλο αποικοδόμησης λιγνίνης από μύκητες λευκής σήψης⁴²

1.3.2.1 Λακκάσες

Οι λακκάσες ανήκουν στην οικογένεια των πολυφαινολικών οξειδασών που περιέχουν άτομα χαλκού στο ενεργό τους κέντρο (multicopper oxidases)^{1,4}. Ρόλος τους είναι να καταλύουν την μονο-ηλεκτρονιακή οξείδωση των φαινολικών, των αρωματικών αμινών, και άλλων υποστρωμάτων πλούσιων σε ηλεκτρόνια, με ταυτόχρονη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό, σύμφωνα με την αντίδραση που φαίνεται στην Εικόνα 15.



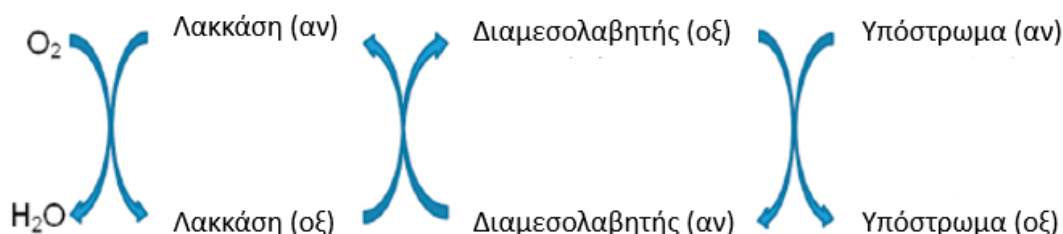
Εικόνα 15. Γενική αντίδραση καταλυτικής δράσης λακκάσης¹

Η πλειονότητα των λακκασών που έχουν βρεθεί και χαρακτηρησθεί έως σήμερα προέρχεται από μύκητες λευκής σήψης, ωστόσο παραγωγοί των ενζύμων αυτών μπορεί να είναι, επίσης, έντομα, φυτά και βακτήρια. Οι λακκάσες μυκητιακής προέλευσης είναι κυρίως εξωκυτταρικές γλυκοπρωτεΐνες, με μοριακό βάρος μεταξύ 60 και 70 kDa και με ισοηλεκτρικό σημείο που κυμαίνεται από 3 έως 6⁴. Παρά το γεγονός ότι οι λακκάσες αναφέρονταν και ως διφαινολικές οξειδάσες, μονοφαινόλες, όπως η γουαϊακόλη και η 2,6-διμεθοξυφαινόλη, αποτελούν καλύτερα υποστρώματα σε σύγκριση με τις διφαινόλες, όπως η κατεχόλη και η υδροκινόνη³³.

Οι λακκάσες εμφανίζονται συχνά ως ισοένζυμα, με μονομερείς ή διμερείς πρωτεϊνικές δομές, όλες με παρόμοια αρχιτεκτονική αποτελούμενη από τρεις διαδοχικά διατεταγμένους τομείς, δομής β-βαρελιού¹. Το ενεργό τους κέντρο περιλαμβάνει τέσσερα άτομα χαλκού σε τρεις ομάδες (T1, T2, T3). Τα άτομα χαλκού διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τα σήματα ηλεκτρονιακού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR). Ο χαλκός T1 είναι υπεύθυνος για το μπλε χρώμα του ενζύμου και έχει χαρακτηριστική απορρόφηση περίπου στα 610 nm. Ο χαλκός T2 είναι άχρωμος και δεν μπορεί να ανιχνευθεί φασματοφωτομετρικά, αλλά ανιχνεύεται μέσω EPR. Τέλος, ο διπυρηνικός χαλκός T3 είναι διαμαγνητικός, ενώ εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό φάσμα φθορισμού και απορρόφηση στα 330 nm³. Οι χαλκοί T2 και T3 βρίσκονται σε κοντινές θέσεις, σχηματίζοντας ένα τριπυρηνικό κέντρο που εμπλέκεται στον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου. Με βάση τις ιδιότητες των διαφόρων τύπων χαλκού, τα ένζυμα αυτά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες: λακκάσες υψηλού (0,6–0,8 V) και χαμηλού (0,4–0,6 V) οξειδοαναγωγικού δυναμικού¹.

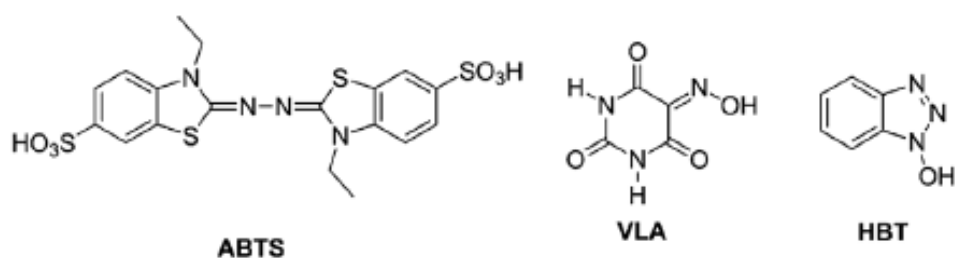
Όπως φαίνεται παραπάνω, οι λακκάσες έχουν σχετικά χαμηλά δυναμικά οξειδοαναγωγής, μικρότερα των 0,8 V, συγκριτικά με τις λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες, των οποίων το δυναμικό λαμβάνει τιμές μεγαλύτερες του 1 V⁵⁵. Έτσι, η δράση τους θα περιοριζόταν στην οξείδωση μόνο του φαινολικού τμήματος λιγνίνης, το οποίο καταλαμβάνει περίπου το 20% αυτής, καθώς τα μη φαινολικά υποστρώματα απαιτούν δυναμικό οξειδοαναγωγής άνω των 1,3 V για να μπορέσουν να οξειδωθούν¹. Ωστόσο, ο περιορισμός αυτός έχει ξεπεραστεί, μέσω της μίμησης της φύσης, με τη χρήση οξειδοαναγωγικών διαμεσολαβητών και το λεγόμενο σύστημα λακκάσης-διαμεσολαβητή (laccase-mediator system, LMS)⁵⁵. Οι διαμεσολαβητές αποτελούν μικρές φυσικές και συνθετικές ενώσεις χαμηλού

μοριακού βάρους, οι οποίες λόγω του υψηλότερου οξειδοαναγωγικού δυναμικού, με τιμές μεγαλύτερες των 0,9 V, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την οξείδωση του μη φαινολικού τμήματος της λιγνίνης^{55,56}. Κατά την καταλυτική δράση της λακκάσης, ο διαμεσολαβητής οξειδώνεται συνεχώς από το ένζυμο και ανάγεται, στη συνέχεια, από το υπόστρωμα, δρώντας ως φορέας ηλεκτρονίων ανάμεσα στη λακκάση και το υπόστρωμα, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 16.



Εικόνα 16. Καταλυτική αντίδραση με το σύστημα λακκάσης-διαμεσολαβητή¹

Φαινολικά προϊόντα της αποικοδόμησης της λιγνίνης από μύκητες λευκής σήψης, αλλά και συνθετικά μόρια, όπως το ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), το βιολουρικό οξύ (VLA), το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο (HBT), το π-κουμαρικό οξύ, η βανιλίνη και το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, θεωρούνται καλοί διαμεσολαβητές¹. Η επιλογή των κατάλληλων διαμεσολαβητών παίζει καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα του συστήματος λακκάσης-διαμεσολαβητή, καθώς οι διαμεσολαβητές, όπως και τα ένζυμα, είναι επιλεκτικοί ως προς το υπόστρωμα. Ως γενικά χαρακτηριστικά ενός ιδανικού διαμεσολαβητή ορίζεται η μη τοξικότητα, το χαμηλό κόστος και η αποτελεσματικότητα, η σταθερότητα της οξειδωμένης και της ανηγμένης μορφής του, όπως επίσης και η ικανότητα διατήρησης μιας συνεχόμενης κυκλικής οξειδοαναγωγικής μετατροπής^{55,57}.



Εικόνα 17. Χημική δομή τριών ενώσεων που δρουν ως διαμεσολαβητές¹

Ως προς τις καταλυτικές τους ιδιότητες, ενώ το εύρος των υποστρωμάτων που οξειδώνονται από τις λακκάσες είναι μεγάλο, οι κινητικές σταθερές του ενζύμου (K_M και k_{cat}) έχουν προσδιοριστεί για περιορισμένο αριθμό ενώσεων, όπως το ABTS, η γουαϊακόλη, η συρινγκαλζαδίνη και η 2,6-διμεθοξυφαινόλη (2,6-DMP)⁴. Η σταθερά Michaelis-Menten, K_M , λαμβάνει χαμηλές τιμές (της τάξεως των μερικών δεκάδων μM) για υποστρώματα, όπως το ABTS και η συρινγκαλδαζίνη, με τα οποία το ένζυμο έχει υψηλό βαθμό συγγένειας, ενώ, αντίστοιχα, για υποστρώματα, όπως η 2,6-DMP και η γουαϊακόλη, με τα οποία παρουσιάζει χαμηλότερη συγγένεια, η K_M λαμβάνει υψηλότερες τιμές (της τάξεως των μερικών εκατοντάδων μM)⁴. Χαρακτηριστικά, για

τα συγκεκριμένα υποστρώματα, αναφέρεται το εύρος των τιμών της K_M που έχουν εντοπιστεί στη βιβλιογραφία, καθώς και μία τυπική μέση τιμή της σταθεράς αυτής: ABTS (4-770 μM και μέση τιμή της τάξεως των 40 μM), συρινγκαλδαζίνη (3-4307 μM και μέση τιμή της τάξεως των 40 μM), 2,6-DMP (26-14720 μM και μέση τιμή της τάξεως των 400 μM), και γουαϊακόλη (4-30000 μM και μέση τιμή της τάξεως των 400 μM)⁴. Χαμηλές τιμές K_M είναι χαρακτηριστικές και για τα υποστρώματα: σιναπικό οξύ, υδροκινόνη και συρινγικό οξύ, αλλά και για πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, ενώ υψηλότερες τιμές παρουσιάζουν οι πάρα-υποκατεστημένες φαινόλες, την πενταχλωροφαινόλη και το βανιλικό οξύ⁴. Τονίζεται, πως οι προτιμήσεις των ενζύμων αυτών είναι διαφορετικές μεταξύ των διαφόρων λακκασών, ενώ αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τις προτιμήσεις τους σε όρθο- (όπως γουαϊακόλη, καφεϊκό οξύ, κατεχόλη, πρωτοκατεχουϊκό οξύ, γαλλικό οξύ και πυρογαλλόλη), πάρα- (όπως π-κρεσόλη και υδροκινόνη) και μέτα-υποκατεστημένες φαινόλες (όπως ορσινόλη, ρεσορκινόλη και φλωρογλυκινόλη)^{4,58}.

Ως προς τις βέλτιστες συνθήκες κατάλυσης, το βέλτιστο pH των λακκασών φαίνεται να λαμβάνει όξινες τιμές⁴. Πιο συγκεκριμένα, το βέλτιστο pH για το ABTS είναι, συνήθως, χαμηλότερο του 4, για φαινολικές ενώσεις, όπως την 2,6-DMP, την γουαϊακόλη και την συρινγκαλδαζίνη, το εύρος κυμαίνεται από 4 έως 7, για την υδροκινόνη το βέλτιστο pH εντοπίζεται μεταξύ των τιμών 3,6 και 4, ενώ για την κατεχόλη μεταξύ των τιμών 3,5 και 6,^{24,59,60}. Η καμπανοειδής μορφή του προφίλ της συσχέτισης της ενεργότητας των λακκασών με το pH για τα φαινολικά υποστρώματα οφείλεται στην συνύπαρξη δύο αντίρροπων φαινομένων. Το πρώτο σχετίζεται με τη διαφορά οξειδοαναγωγικού δυναμικού μεταξύ του υποστρώματος και του χαλκού T1 της λακκάσης, με τη μεταφορά ηλεκτρονίων να ευνοείται σε υψηλότερα pH. Το δεύτερο, ωστόσο, φαινόμενο σχετίζεται με την πρόσδεση ενός ανιόντος υδροξειδίου στους χαλκούς T2-T3 σε υψηλότερα pH, παρεμποδίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο την εσωτερική μεταφορά ηλεκτρονίων από τον χαλκό T1 στους T2-T3⁴. Γενικά, η σταθερότητα των μυκητιακών λακκασών είναι μεγαλύτερη σε όξινα pH, με πολλές, ωστόσο, εξαιρέσεις. Ως προς τη θερμοκρασία, η βέλτιστη τιμή της δε διαφέρει ιδιαίτερα από εκείνη άλλων εξωκυτταρικών λιγνινολυτικών ενζύμων. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργότητα των λακκασών εμφανίζει, συνήθως, μέγιστο μεταξύ των τιμών 50 και 70 °C⁴, με ορισμένα, όμως, ένζυμα να εμφανίζουν βέλτιστη δράση σε θερμοκρασίες μικρότερες των 35 °C⁶¹.

1.3.2.2 Υπεροξειδάσες

Όπως προαναφέρθηκε, οι μύκητες λευκής σήψης παράγουν τρεις υπεροξειδάσες που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης (MnP, LiP, VP), ένζυμα τα οποία ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των οξειδοαναγωγικών ενζύμων. Η LiP χαρακτηρίζεται από την ικανότητά της να οξειδώνει αρωματικές ενώσεις υψηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, ενώ η MnP απαιτεί το Mn^{2+} για να ολοκληρώσει τον καταλυτικό κύκλο, σχηματίζοντας χηλικά Mn^{3+} που δρουν ως διάχυτοι οξειδωτές. Τέλος, η ευέλικτη υπεροξειδάση, μπορεί να οξειδώσει τόσο το Mn^{2+} , όσο και μη φαινολικές αρωματικές ενώσεις, φαινόλες και βαφές⁶².

Οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP) αποτελούν εξωκυτταρικές αιμο-πρωτεΐνες, που εξαρτώνται από το H_2O_2 , με ασυνήθιστα υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό και χαμηλό βέλτιστο pH. Το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 37 έως 50 kDa, ενώ το

ισοηλεκτρικό τους σημείο λαμβάνει όξινες τιμές³³. Οι LiP διαθέτουν την ικανότητα οξειδωσης ποικίλου εύρους αναγωγικών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των πολυμερών. Χάρη στο υψηλό αυτό οξειδοαναγωγικό δυναμικό, αλλά και στο εύρος υποστρωμάτων που μπορούν να οξειδώσουν, οι LiP αποτελούν πολλά υποσχόμενους υποψηφίους για εφαρμογή σε βιομηχανικές διεργασίες⁶³. Η μικρή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, τους επιτρέπει να αντιδρούν με ποικίλες ενώσεις-μοντέλα λιγνίνης, αλλά και με μόρια διαφορετικής προέλευσης που δεν σχετίζονται με τη δομή αυτή. Το ένζυμο αυτό διακρίνεται για την ικανότητά του να οξειδώνει μεθοξυλιωμένους αρωματικούς δακτυλίους χωρίς ελεύθερη φαινολική ομάδα, δημιουργώντας ρίζες κατιόντων που μπορούν να αντιδράσουν περαιτέρω μέσω διάφορων οδών, όπως η διάνοιξη δακτυλίου και η απομεθυλίωση. Επιπλέον, οι LiP, σε αντίθεση με τις λακκάσες, δεν απαιτούν διαμεσολαβητές για να αποικοδομήσουν ενώσεις υψηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, ωστόσο για την έναρξη της βιοκατάλυσης είναι αναγκαία η παρουσία H_2O_2 ³.

Οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP) αποτελούν γλυκοζυλιωμένες εξωκυτταρικές αιμο-πρωτεΐνες, με συνήθη μοριακά βάρη από 40 έως 50 kDa και όξινο ισοηλεκτρικό σημείο^{1,33}. Τα ένζυμα αυτά φαίνεται να είναι πιο διαδεδομένα στους μύκητες λευκής σήψης σε σύγκριση με τις υπεροξειδάσες της λιγνίνης, ενώ ρόλος τους είναι να οξειδώνουν το Mn^{2+} σε Mn^{3+} , το οποίο, στη συνέχεια, οξειδώνει τις φαινολικές δομές σε ρίζες φαινοξυλίου. Το προϊόν Mn^{3+} είναι έντονα αντιδραστικό και δημιουργεί σύμπλοκα με χηλικούς οργανικούς διαλύτες, τους οποίους παράγει ο ίδιος ο μύκητας¹. Οι MnP έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν ένα εύρος σύνθετων φαινολικών και μη ενώσεων, με προτίμηση στην πρώτη κατηγορία, ενώ εμφανίζουν έντονη οξειδωτική δράση στην αποικοδόμηση συνθετικής λιγνίνης και λιγνίνης φυτικής προέλευσης *in vitro*⁶⁴. Επιπλέον, μπορούν να παράξουν, σε ορισμένες περιπτώσεις, H_2O_2 κατά την οξείδωση ορισμένων θειολών και $NAD(P)H_2$, ενώ ορισμένες διαθέτουν την ικανότητα αυτό-κατάλυσης, απουσία εξωτερικού υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω οξείδωσης οργανικών οξέων, προς παραγωγή φαινοξυλικών ριζών που επιδρούν πάνω στη δομή της λιγνίνης. Τονίζεται ότι το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του συστήματος της υπεροξειδάσης του μαγγανίου είναι χαμηλότερο από εκείνο της υπεροξειδάσης της λιγνίνης^{3,65}.

Λόγω της οξειδωτικής τους δράσης στο Mn, οι ευέλικτες υπεροξειδάσες (VP) περιγράφηκαν αρχικά ως ένζυμα της οικογένειας των MnP, ωστόσο αργότερα αναγνωρίστηκαν ως εκπρόσωποι ενός νέου τύπου υπεροξειδάσης. Οι VP μπορούν να οξειδώσουν αποτελεσματικά τις φαινολικές ενώσεις και τις βαφές που αποτελούν τα υποστρώματα των γενικών και Mn-εξαρτώμενων υπεροξειδάσων, οξειδώνοντας το Mn^{2+} , όπως κάνουν οι MnP, αλλά και αρωματικές ενώσεις υψηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, όπως κάνουν οι LiP³. Το ενδιαφέρον για την VP έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, τόσο ως προς τη μελέτη του ίδιου του ενζύμου, όσο και για την αξιοποίησή του σε εφαρμογές βιομηχανικής και περιβαλλοντικής βιοκατάλυσης⁶⁶.

1.3.2.3 Εφαρμογές

Τα λιγνινολυτικά ένζυμα έχουν εφαρμοστεί ή παρουσιάζουν προοπτικές για αξιοποίηση σε ένα μεγάλο εύρος βιοτεχνολογικών εφαρμογών, όπως η παραγωγή βιοκαυσίμων, η βιοεξυγίανση ξενοβιοτικών, η αποτοξικοποίηση υδατικών αποβλήτων, καθώς και εφαρμογές οργανικής σύνθεσης και αξιοποίηση στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών¹. Από όλα τα λιγνινολυτικά ένζυμα, οι λακκάσες φαίνεται να είναι οι πιο κατάλληλες για χρήση σε εφαρμογές μεγάλης κλίμακας. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αφθονία των μικροβιακών παραγωγών λακκασών, στη δυνατότητα χρήσης τόσο βυθισμένων όσο και στερεών καλλιέργειών, στο μεγάλο εύρος υποστρωμάτων που μπορούν να διασπάσουν, όπως και στην ικανότητά τους να χρησιμοποιούν το οξυγόνο της ατμόσφαιρας ως δότη ηλεκτρονίων, σε αντίθεση με τις υπεροξειδάσες που απαιτούν την παρουσία H₂O₂ για να δράσουν¹.

Το λιγνινολυτικό σύστημα των Βασιδιομυκήτων μπορεί να αξιοποιηθεί βιοτεχνολογικά για την απομάκρυνση της λιγνίνης από τη βιομάζα αγροτικής προέλευσης. Η αυξανόμενη ζήτηση ενέργειας και η εξάντληση των αποθεμάτων ορυκτών καυσίμων απαιτούν την εύρεση εναλλακτικών πηγών, μία εκ των οποίων είναι η βιοαιθανόλη. Ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης από την κυτταρίνη είναι η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα. Ωστόσο, η λιγνίνη αποτελεί παρεμποδιστικό παράγοντα στην παραγωγή αυτή. Η εξαιρετικά ανθεκτική δομή της λιγνίνης καθιστά την ενζυμική και χημική αποδόμησή της προβληματική. Για το λόγο αυτό, η αποικοδόμηση της λιγνίνης είναι απαραίτητη για τη σακχαροποίηση των πολυσακχαριτών της βιομάζας. Απαιτούνται, λοιπόν, διεργασίες προκατεργασίας, οι οποίες θα πρέπει να τροποποιούν κατά κύριο λόγο τη λιγνίνη, χωρίς να διασπών τους δομικούς υδατάνθρακες, και οι οποίες θα είναι ήπιες και δεν θα συνεπάγονται μεγάλη παραγωγή αποβλήτων και ρύπων. Διάφορες χημικές και φυσικοχημικές διεργασίες προκατεργασίας, όπως όξινη και αλκαλική, έκρηξη ατμού και έκρηξη αμμωνίας, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της ενζυμικής υδρόλυσης της λιγνινοκυτταρίνης⁶⁷, οι οποίες, ωστόσο, απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, με αποτέλεσμα το υψηλό κόστος και τα ανεπιθύμητα προϊόντα. Ως εναλλακτική προτείνεται η βιολογική προκατεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων με τη χρήση λιγνινολυτικών μυκήτων ή των ενζύμων τους⁶⁸. Τόσο το σύστημα λιγνίνης-διαμεσολαβητή, όσο και οι υπεροξειδάσες, ή ακόμη και μίγματα δύο ή τριών λιγνινολυτικών ενζύμων, έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό στη βιολογική απομάκρυνση της λιγνίνης^{69,70}. Τα λιγνινολυτικά ένζυμα μπορούν να φανούν χρήσιμα στην αποτοξικοποίηση της φυτικής βιομάζας μετά από συμβατικές προκατεργασίες προς απομάκρυνση των τοξικών φαινολικών που απελευθερώνονται, όπως η βανιλίνη, η συριγγκαλδεΐδη, το τρανς-κινναμμικό οξύ και το υδροξυβενζοϊκό οξύ, τα οποία αναστέλλουν τη δράση των κυτταρινασών, και, κατά συνέπεια, μειώνουν την απόδοση της σακχαροποίησης της βιομάζας^{1,71}.

Τα λιγνινολυτικά ένζυμα των μυκήτων λευκής σήψης εμφανίζουν, επίσης, την ικανότητα να τροποποιούν ή ακόμη και να αποικοδομούν ένα μεγάλο εύρος ξενοβιοτικών ενώσεων, όπως αρωματικές αμίνες, χλωροφαινόλες, δευτεροταγείς

αλειφατικές πολυαλκοόλες, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) και παρασιτοκτόνα^{1,72}. Η ικανότητα αυτή βασίζεται στη δομική ομοιότητα πολλών ρυπαντών με την ίδια τη λιγνίνη, αλλά και στη μη εξειδίκευση των λιγνινολυτικών ενζύμων ως προς το υπόστρωμα. Επιπλέον, η διάσπαση ορισμένων τοξικών ενώσεων μπορεί να ενισχυθεί με τη χρήση του συστήματος λακκάσης-διαμεσολαβητή¹. Τονίζεται πως αναφορές εφαρμογής στη βιοεξυγίανση έχουν πραγματοποιηθεί τόσο για τις λακκάσες, όσο και για τις υπεροξειδάσες^{3,73,74}.

Όσον αφορά τη βιομηχανία τροφίμων, η εφαρμογή των λακκασών εντοπίζεται σε διεργασίες που ενισχύουν ή τροποποιούν το χρώμα των τροφίμων και των ποτών, εξαλείφοντας τα ανεπιθύμητα φαινορικά που ευθύνονται για την καστανή όψη και τη θολερότητα σε φυσικούς χυμούς φρούτων, στη μύρα και το κρασί³. Τα ένζυμα αυτά μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό ασκορβικού οξέος, τη ζελατινοποίηση πηκτίνης ζαχαρότευτλων, ενώ βρίσκουν εφαρμογή και στην επεξεργασία αποβλήτων ελαιοτριβείου^{75,76}. Οι λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες, από την άλλη μεριά, μπορούν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή φυσικών αρωματικών γεύσεων^{3,77}.

Σχετικά με τη βιομηχανία παραγωγής και επεξεργασίας χαρτοπολτού και χαρτιού, τα λιγνινολυτικά ένζυμα μπορούν να φανούν πολύ χρήσιμα εργαλεία για τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων του συγκεκριμένου κλάδου, οι μηχανικές και χημικές διεργασίες του οποίου συνεπάγονται την κατανάλωση υπέρογκων ποσοτήτων πρώτων υλών, νερού και ενέργειας¹. Πιο συγκεκριμένα, οι λακκάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην απομάκρυνση της λιγνίνης, τον αποχρωματισμό, καθώς και στην αποτοξικοποίηση των λυμάτων^{78,79}. Η χρήση διαμεσολαβητών, όπως το ABTS και το HBT, συμβάλλουν στην απομάκρυνση της λιγνίνης από τον χαρτοπολτό, συνεπάγοντας ενίσχυση του λευκού χρώματός του. Επιπλέον, η συνδυαστική χρήση του συστήματος λακκάσης-διαμεσολαβητή με κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες μπορεί να ενισχύσει ακόμη περισσότερο τη διαδικασία αποχρωματισμού, βελτιώνοντας περαιτέρω τις φυσικοχημικές και οπτικές ιδιότητες του χαρτοπολτού, με τον ενζυμικό αυτό συνδυασμό να αποτελεί μία αποτελεσματική οικολογική λύση^{1,80}. Ως προς τις υπεροξειδάσες, οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης βρίσκουν εφαρμογές στη λεύκανση του χαρτοπολτού, εμφανίζοντας καλύτερες αποδόσεις σε σύγκριση με τις λακκάσες, ενώ και οι LiP και οι MnP μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον αποχρωματισμό των υγρών αποβλήτων της συγκεκριμένης βιομηχανίας^{1,81}.

Μία ακόμη πιθανή εφαρμογή του συστήματος λιγνίνης-διαμεσολαβητή είναι στην ενζυμική τροποποίηση των βαφών στην υφαντουργική βιομηχανία^{3,82}. Οι βαφές αυτές αποτελούν ενώσεις που διασπώνται δύσκολα, ενώ εμποδίζουν το φως να διαπεράσει τα ύδατα, οδηγώντας σε μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των υδρόβιων φυτών, συνεπάγοντας την ελάττωση της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου και τον περιορισμό της βιοαποικοδόμησης της οργανικής ύλης¹. Οι περισσότερες, όμως, διεργασίες επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων της βιομηχανίας βαφών που χρησιμοποιούνται σήμερα (όπως προσρόφηση, καθίζηση, οξείδωση, κροκίδωση, φωταποικοδόμηση) μειονεκτούν και ως προς την

αποτελεσματικότητα αλλά και ως προς το κόστος⁸³. Έτσι, η ανάπτυξη διεργασιών βασιζόμενων στη δράση των λακκασών φαίνεται μία ελκυστική λύση χάρη στην ικανότητα των ενζύμων αυτών να αποικοδομούν ένα μεγάλο εύρος σύνθετων χημικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων δομών βαφών, όπως ετεροκυκλικές ενώσεις, πολυμερή, τριφαινομεθάνιο, ανθρακοκινόνες και φθαλοκυανίνη^{84,85}. Επιπλέον, τόσο οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης⁷⁴ όσο και οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου⁸⁶ διαθέτουν την ικανότητα αποχρωματισμού διαφόρων συνθετικών βαφών, ωστόσο η χρήση ελεύθερων και ακινητοποιημένων λακκασών, με ή χωρίς διαμεσολαβητή, φαίνεται να είναι πιο διαδεδομένη¹.

Αυξανόμενο είναι, επίσης, και το ενδιαφέρον γύρω από την εφαρμογή των λακκασών ως νέου βιοκαταλύτη στην οργανική σύνθεση³. Ο ενζυμικός πολυμερισμός με τη χρήση λακκασών έχει προσελκύσει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας, καθώς οι λακκάσες, με ή χωρίς διαμεσολαβητή, είναι ικανές να συνθέσουν άμεσα πολυμερή που είναι αδύνατο να παραχθούν μέσω της συμβατικής χημικής σύνθεσης. Μερικές από τις εφαρμογές των ενζύμων αυτών στην οργανική σύνθεση περιλαμβάνουν την οξείδωση λειτουργικών ομάδων, τη σύζευξη φαινολών και στεροειδών, την σύνθεση ιατρικών παραγόντων, όπως αναισθητικά, αντιφλεγμονώδη, αντιβιοτικά και ηρεμιστικά, τον σχηματισμό δεσμών αζώτου-άνθρακα και τη σύνθεση πολύπλοκων σύνθετων ενώσεων στη βιομηχανία των καλλυντικών^{3,87,88}. Τόσο οι λακκάσες, όσο και οι υπεροξειδάσες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως βιοαισθητήρες^{89,90}. Η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) παρουσιάζει την υψηλότερη βιοηλεκτροκαταλυτική ενεργότητα, γεγονός που την καθιστά υποψήφια για εμπορική ανάπτυξη βιοαισθητήρων για πολυμερικές φαινόλες και λιγνίνη, ενώ η χρήση της προτείνεται και για οργανική σύνθεση για την παραγωγή καλλυντικών προϊόντων για δερματική χορήγηση⁹¹. Η υπεροξειδάση του μαγγανίου, αντίστοιχα, διαθέτει αποτελεσματικές ιδιότητες άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων (direct electron transfer, DET) μέσω ηλεκτροδίων και, ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές όπως είναι η ανάπτυξη βιοαισθητήρων βασισμένων σε DET και κυψελών καυσίμων, αλλά και στην εκλεκτική οργανική σύνθεση⁹².

1.4 Στόχος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στη μελέτη του ενζυμικού συστήματος αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρίνης από επιλεγμένα ελληνικά στελέχη Βασιδιομυκήτων και την αξιοποίησή του σε εφαρμογές βιοαποικοδόμησης. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η επαγωγή και έκφραση των παραγόμενων ενζύμων κατά την ανάπτυξη των μυκήτων σε ξυλάνη βρώμης και σε στελέχη αραβοσίτου, με στόχο την κατανόηση των στρατηγικών αποικοδόμησης της βιομάζας, καθώς και την απομόνωση ενζύμων με αξιοσημείωτες ιδιότητες βιοκατάλυσης και αξιοποίηση αυτών σε εφαρμογές βιοεξυγίανσης.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε το ενζυμικό δυναμικό τριών στελεχών Βασιδιομυκήτων: του *Pleurotus citrinopileatus* LGAM 28684, του *Abortiporus biennis* LGAM 436 και του *Ganoderma resinaceum* LGAM 334. Τα στελέχη αυτά παρελήφθησαν από τη Μυκητοθήκη του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, με υπεύθυνο τον Γεώργιο Ζερβάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Φυτικής Παραγωγής. Μετά την παραλαβή τους διατηρούνταν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA στους 4°C.

2.1.2 Χημικά Αντιδραστήρια και Αναλώσιμα Υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες AppliChem (Γερμανία), LAB-SCAN (Ιρλανδία), Megazyme (Ιρλανδία) και Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.) και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα γυάλινα και πλαστικά σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν προϊόντα των εταιριών Eppendorf (Γερμανία), Greiner-Bio One (Γερμανία), Millipore (Η.Π.Α.), ROTH (Η.Π.Α.), SCHOTT AG (Γερμανία) και Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο).

2.1.3 Ρυθμιστικά Διαλύματα

Η σύσταση και το pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και των διαλυμάτων των ηλεκτροφορήσεων, περιγράφονται στους Πίνακες 2 και 3, αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων

Ρυθμιστικό Διάλυμα	pH	Συστατικά	Συγκέντρωση (mM)
Κιτρικού - Φωσφορικών	3-5,5	Na ₂ HPO ₄	100
		Κιτρικό Οξύ	100
Φωσφορικών	6-7	K ₂ HPO ₄	100
		KH ₂ PO ₄	100
MOPS	6	MOPS	100
Bis-Tris	7,5	Bis-Tris	200
		HCl (πυκνό)	100
Tris-HCl	7,5	Tris-base	20
		HCl (πυκνό)	100
Tris-HCl	8-9	Tris-base	100
		HCl (πυκνό)	100

Πίνακας 3. Σύσταση διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης

Διάλυμα	pH	Συστατικά
Ρυθμιστικό Διάλυμα Δείγματος SDS-PAGE Ηλεκτροφόρησης (Sample buffer)	6,8	3,55 mL 0,25 M Tris-base, 1,8 mL γλυκερόλη 50% v/v, 1,8 mL β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,71 g SDS, 2,85 mL μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% w/v
Ρυθμιστικό Διάλυμα x5 Δείγματος Native Ηλεκτροφόρησης		50% v/v γλυκερόλη, 0,1% v/v μπλε της βρωμοφαινόλης
Ρυθμιστικό Διάλυμα SDS-PAGE Ηλεκτροφόρησης (Running buffer)	8,3	3,03 g/L Tris-base, 14,4 g/L γλυκίνη, 1 g/L SDS
Διάλυμα Χρωματισμού Πηκτώματος SDS-PAGE (Staining solution)		0,4% w/v Coomassie G-250, 400 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 500 mL dH ₂ O
Διάλυμα Αποχρωματισμού Πηκτώματος SDS-PAGE (Destaining solution)		200 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 700 mL dH ₂ O

2.1.4 Συσκευές – Όργανα

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- pH-μετρο 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενοι ανακινούμενοι επωαστήρες Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντρος J2-21, Beckman Coulter (Η.Π.Α.), και Rotanta 460R, Hettich (Γερμανία)
- Μικροφυγόκεντρος πάγκου Zentrifuge Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Συσκευή λυοφιλίωσης Freezmobile 12SL Freeze Dryer, VirTis
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης Nuova II Stir Plate της Thermolyne και Stirrer Magnetic w Hotplate της Bioline scientific (Ελλάδα)
- Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και Abs 120-4 (KERN & Sohn GmbH)
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250, Molecular Devices (Η.Π.Α.)

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis System, Biorad (Η.Π.Α.)
- Αντλία Econo Gradient, Biorad (Η.Π.Α.)
- Ανιχνευτής Econo UV Monitor, Biorad (Η.Π.Α.)
- Κλασματοσυλλέκτης SF-2120 Super Fraction Collector, Advantec
- Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, Shimadzu (Ιαπωνία)
- Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, Agilent Technologies (Η.Π.Α.)
- Φούρνος στήλης HPLC, Millipore Waters (Η.Π.Α.)

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Καλλιέργειες και θρεπτικά μέσα

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα υπερκείμενα υγρών καλλιεργειών των τριών στελεχών Βασιδιομυκήτων, σε δύο διαφορετικά υποστρώματα: ξυλάνη βρώμης και στελέχη αραβοσίτου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες των στελεχών *P. citrinopileatus* και του *A. biennis* σε υπόστρωμα ξυλόζης, καθώς και σε στελέχη αραβοσίτου, με σκοπό την πρωτεομική ανάλυση των υπερκείμενων υγρών.

2.2.1.1 Καλλιέργειες σε ξυλάνη βρώμης

Το θρεπτικό μέσο των καλλιεργειών της ξυλάνης βρώμης αποτελούνταν από 2% (w/v) στερεού υποστρώματος διαλυμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 100 mM, pH 6, τελικού όγκου 100 mL ανά κωνική φιάλη Erlenmeyer χωρητικότητας 250 mL, ενώ προστέθηκαν και 5 g/L υγρού διαβροχής αραβοσίτου (corn steep liquor). Στη συνέχεια, τα θρεπτικά μέσα αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο Labo Autoclave σε θερμοκρασία 121°C για 20 min. Για τον εμβολιασμό κάθε κωνικής φιάλης χρησιμοποιήθηκαν 3 τετράγωνα τεμάχια άγαρ στερεής καλλιέργειας των μικροοργανισμών, πλευράς 6 mm. Οι κωνικές φιάλες επώαστηκαν, κατόπιν, στους 27°C, υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης 100 rpm, για 19 ημέρες.

Για τη μελέτη των εξωκυτταρικών ξυλανολυτικών ενζύμων που παράγονται από τα τρία στελέχη μυκήτων κατά την ανάπτυξή τους στο συγκεκριμένο υπόστρωμα, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 1 mL από το υπερκείμενο υγρό της κάθε καλλιέργειας, ανά δύο ημέρες. Σημειώνεται, πως για κάθε στέλεχος Βασιδιομύκητα πραγματοποιήθηκε διπλή καλλιέργεια, σε ίδιες συνθήκες, για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, ενώ, επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν δύο καλλιέργειες απουσία μικροοργανισμού («τυφλό»), με στόχο την αφαίρεση κατά τον υπολογισμό των ενζυμικών ενεργοτήτων τυχόν θορύβου που μπορεί να προκληθεί από τα συστατικά του υποστρώματος. Μετά από κάθε δειγματοληψία, τα δείγματα οδηγούνταν προς φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο Eppendorf πάγκου για περίπου 2 min, με στόχο την απομάκρυνση στερεών που ελήφθησαν μαζί με το υπερκείμενο. Επισημαίνεται η συνεχής παρουσία πάγου για τη φύλαξη των δειγμάτων προς διαφύλαξη της σταθερότητας των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται σε αυτά.

2.2.1.2 Καλλιέργειες σε στελέχη αραβοσίτου

Για την καλλιέργεια των μυκήτων σε στελέχη αραβοσίτου για τη μελέτη του ενζυμικού τους προφίλ πραγματοποιήθηκε, αρχικά, προκαλλιέργεια αυτών με σκοπό την αύξηση της βιομάζας τους. Το θρεπτικό μέσο των προκαλλιεργειών αποτελούταν από 5,7% (w/v) D-(+)-ξυλόζης διαλυμένης σε υδατικό διάλυμα τελικού όγκου 100 mL ανά κωνική φιάλη Erlenmeyer 250 mL και σύστασης: 30 g/L εκχύλισμα βύνης (yeast extract), 1 g/L K_2HPO_4 και 0,2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 6. Ύστερα από αποστείρωση με τη μέθοδο που προαναφέρθηκε, τα μέσα ανάπτυξης εμβολιάστηκαν με 3 τετράγωνα τεμάχια άγαρ στερεής καλλιέργειας των μικροοργανισμών ανά κωνική φιάλη, πλευράς 6 mm το κάθε ένα, ενώ ακολούθησε προσθήκη διαλύματος αμπικιλίνης τελικής συγκέντρωσης 0,1 mg/mL. Οι κωνικές φιάλες επώαστηκαν στους 27°C, υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης 100 rpm, ενώ η διάρκεια της επώασης καθορίστηκε από τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, η επώαση διήρκησε 10 ημέρες για το στέλεχος *Ganoderma resinaceum*, 13 ημέρες για το *Pleurotus citrinopileatus* και 24 ημέρες για το *Abortiporus biennis*. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15 min στα 4500 rpm και έκπλυση της βιομάζας που αναπτύχθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, η οποία αποτέλεσε το εμβόλιο για τις υγρές καλλιέργειες. Το θρεπτικό μέσο των καλλιεργειών αυτών αποτελούταν από 4% (w/v) στελέχη αραβοσίτου διαλυμένου σε υδατικό διάλυμα τελικού όγκου 100 mL ανά κωνική φιάλη Erlenmeyer 250 mL και σύστασης: 1 g/L NH_4NO_3 , 0,8 g/L KH_2PO_4 , 0,2 g/L Na_2HPO_4 , 0,5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ και 2 g/L $(NH_4)_2C_4H_4O_6$. Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 6 με HCl. Ύστερα από αποστείρωση, τα μέσα ανάπτυξης εμβολιάστηκαν με τη βιομάζα της αντίστοιχης προκαλλιεργείας, δηλαδή κάθε καλλιέργεια των 100 mL εμβολιάστηκε με τη βιομάζα που αναπτύχθηκε σε 100 mL προκαλλιεργείας. Στη συνέχεια, ακολούθησε προσθήκη διαλύματος αμπικιλίνης τελικής συγκέντρωσης 0,1 mg/mL και οι κωνικές φιάλες επώαστηκαν στους 27°C, υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης 100 rpm, για 14 ημέρες.

Για τη μελέτη των εξωκυτταρικών ξυλανολυτικών και λιγνινολυτικών ενζύμων που παράγονται από τα τρία στελέχη μυκήτων κατά την ανάπτυξή τους στο συγκεκριμένο υπόστρωμα, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 1 mL από το υπερκείμενο υγρό της κάθε καλλιέργειας, ανά δύο ημέρες. Σημειώνεται, πως για κάθε στέλεχος Βασιδιομύκητα πραγματοποιήθηκε διπλή καλλιέργεια, σε ίδιες συνθήκες, για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, ενώ, επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν δύο καλλιέργειες απουσία μικροοργανισμού («τυφλό»), με στόχο την αφαίρεση κατά τον υπολογισμό των ενζυμικών ενεργοτήτων τυχόν θορύβου που μπορεί να προκληθεί από τα συστατικά του υποστρώματος. Μετά από κάθε δειγματοληψία, τα δείγματα οδηγούνταν προς φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο Eppendorf πάγκου για περίπου 2 min, με στόχο την απομάκρυνση στερεών που ελήφθησαν μαζί με το υπερκείμενο. Επισημαίνεται η συνεχής παρουσία πάγου για τη φύλαξη των δειγμάτων προς διαφύλαξη της σταθερότητας των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται σε αυτά.

Μετά το πέρας της επώασης των τριών στελεχών στο μέσο ανάπτυξης, η βιομάζα (υπόστρωμα και κύτταρα) απομακρύνθηκε μέσω απλής διήθησης και οι υγρές φάσεις

των καλλιιεργειών φυγοκεντρήθηκαν για 15 min σε 10000 rpm. Οι προς μελέτη πρωτεΐνες εκκρίνονται εξωκυτταρικά, επομένως λαμβάνονται με το υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρωσης, το οποίο, στη συνέχεια, οδηγήθηκε προς διήθηση με χάρτινο ηθμό, ενώ ακολούθησαν δύο διαδοχικές διηθήσεις υπό κενό σε φίλτρο διαμέτρου 0,8 και 0,2 μm. Τονίζεται πως καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας το υπερκείμενο υγρό διατηρήθηκε σε πάγο για την διασφάλιση της σταθερότητας του ενζυμικού περιεχομένου του.

Σημειώνεται, πως μόνο για την περίπτωση του *Pleurotus citrinopileatus*, λόγω της προσκόλλησης της μυκηλιακής βιομάζας στο στερεό υπόστρωμα που παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξή του στην υγρή καλλιέργεια (Εικόνα 18), κρίθηκε απαραίτητη η διερεύνηση των ενζύμων που εκκρίθηκαν στην επαφή του μικροοργανισμού με το υπόστρωμα. Ως εκ τούτου, πέρα από την μελέτη του εξωκυτταρικού υγρού των καλλιιεργειών του *P.citrinopileatus*, πραγματοποιήθηκε, επιπλέον, απομόνωση (extraction) των τυχόν προσκολλημένων στη βιομάζα πρωτεϊνών. Για τον σκοπό αυτό, η στερεή φάση της υγρής καλλιέργειας από κάθε φιάλη του συγκεκριμένου στελέχους επώαστηκε με προσθήκη 200 mL ρυθμιστικού διαλύματος Bis-Tris 20mM pH 7,5, το οποίο περιείχε την επιφανειοδραστική ουσία Triton σε συγκέντρωση 0,1 mg/mL. Το μίγμα τέθηκε σε έντονη ανάδευση για περίπου 3 h, μετά το πέρας των οποίων πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για 15 min σε 10000 rpm, από όπου λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό. Στη συνέχεια, για την απομάκρυνση των υπολειπόμενων στερεών, ακολούθησε η διαδικασία διηθήσεων που περιγράφηκε στην παραπάνω παράγραφο.



Εικόνα 18. Υγρή καλλιέργεια του *P. citrinopileatus*. Διακρίνεται η ανάπτυξη του στελέχους σε επαφή με το υπόστρωμα

Μετά τη διήθηση του υγρού καλλιέργειας ακολούθησε συμπύκνωση αυτού σε συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.) η οποία επιτρέπει την διέλευση μακρομορίων μικρότερων από 10 kDa, με αποτέλεσμα τα προς μελέτη ένζυμα να παραμένουν εντός της συσκευής λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους. Σε όλη τη διάρκεια της συμπύκνωσης, το διάλυμα διατηρήθηκε σε πάγο. Ο καθαρισμός της μεμβράνης πραγματοποιήθηκε με τη διέλευση διαλύματος NaOH 0,1 mM και, κατόπιν, απιονισμένου νερού. Η μεμβράνη αποθηκεύτηκε σε υδατικό διάλυμα 20% αιθανόλης.

Για την καλλιέργεια του *Abortiporus biennis* σε στελέχη αραβοσίτου με σκοπό τον καθαρισμό των ενζύμων *AbiLac1* και *AbiLac2* πραγματοποιήθηκε, επίσης, προκαλλιέργεια, με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω, με διάρκεια επώασης 26 ημέρες. Κατόπιν, η αναπτυγμένη βιομάζα φυγοκεντρήθηκε για 15 min στα 4500 rpm και εκπλύθηκε, αποτελώντας εμβόλιο για τις υγρές καλλιέργειες. Το μέσο ανάπτυξης των καλλιεργειών αυτών παρουσίαζε σύσταση ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω για το συγκεκριμένο υπόστρωμα, με τελικό όγκο 500 mL ανά κωνική φιάλη 2 L. Ύστερα από αποστείρωση, κάθε μέσο ανάπτυξης εμβολιάστηκε με βιομάζα προερχόμενη από δύο κωνικές φιάλες προκαλλιέργειας, δηλαδή κάθε καλλιέργεια των 500 mL εμβολιάστηκε με βιομάζα που αναπτύχθηκε σε 200 mL προκαλλιέργειας. Στη συνέχεια, ακολούθησε προσθήκη διαλύματος αμπικιλίνης τελικής συγκέντρωσης 0,1 mg/mL και οι κωνικές φιάλες επώαστηκαν στους 27°C, υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης 100 rpm, για 15 ημέρες.

2.2.1.3 Καλλιέργειες για πρωτεομική ανάλυση

Για τις καλλιέργειες του *P. citrinopileatus* και του *A. biennis* σε ξυλόζη και σε στελέχη αραβοσίτου, με σκοπό τη λήψη δειγμάτων προς πρωτεομική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε, αρχικά, προκαλλιέργεια, με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω, με διάρκεια επώασης 11 και 27 ημέρες, για τα δύο στελέχη αντίστοιχα. Κατόπιν, η αναπτυγμένη βιομάζα φυγοκεντρήθηκε για 15 min στα 4500 rpm και εκπλύθηκε, αποτελώντας εμβόλιο για τις υγρές καλλιέργειες. Το θρεπτικό μέσο των καλλιεργειών αποτελούταν από 4% (w/v) στερεού υποστρώματος (D-(+)-ξυλόζης ή στελεχών αραβοσίτου, αντίστοιχα) διαλυμένου σε υδατικό διάλυμα τελικού όγκου 100 mL ανά κωνική φιάλη Erlenmeyer 250 mL και σύστασης: 1 g/L NH_4NO_3 , 0,8 g/L KH_2PO_4 , 0,2 g/L Na_2HPO_4 , 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$. Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 6 με HCl. Ύστερα από αποστείρωση, τα μέσα ανάπτυξης εμβολιάστηκαν με τη βιομάζα της αντίστοιχης προκαλλιέργειας, δηλαδή κάθε καλλιέργεια των 100 mL εμβολιάστηκε με τη βιομάζα που αναπτύχθηκε σε 100 mL προκαλλιέργειας. Στη συνέχεια, ακολούθησε προσθήκη διαλύματος αμπικιλίνης τελικής συγκέντρωσης 0,1 mg/mL και οι κωνικές φιάλες επώαστηκαν στους 27°C, υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης 100 rpm, για 10 ημέρες για το *P. citrinopileatus* και 12 ημέρες για το *A. biennis*.

2.2.2 Μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων

2.2.2.1 Μέτρηση ενεργότητας ενδο-1,4-β-ξυλανάσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των ενδο-1,4-β-ξυλανασών χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα εμπορικής ξυλάνης ξύλου σημύδας (birchwood xylan) (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.) και προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων που προκύπτουν κατά την υδρόλυσή του, μέσω της μεθόδου δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), η οποία περιγράφεται στην Ενότητα 2.2.3.1.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών pH 5,5, 100 mM και όγκου 200 μL προστέθηκαν 50 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης

αραιώσης και 250 μL υδατικού διαλύματος ξυλάνης ξύλου σημύδας τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 5 g/L (0,5% w/v). Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 500 μL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 45°C, υπό ανάδευση 1100 rpm, και είχε διάρκεια 30 min. Στη συνέχεια, τα αντιδρώντα συστήματα φυγοκεντρήθηκαν για 2 min και ακολούθησε η μέθοδος DNS, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol ξυλόζης ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 5,5 και θερμοκρασία 45°C.

Σημειώνεται πως για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με αύξηση του pH μέσω της προσθήκης του αντιδραστήριου DNS πριν την έναρξη της αντίδρασης.

2.2.2.2 Μέτρηση ενεργότητας εστεράσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των εστερασών χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα p-nitrophenyl acetate (pNPA), το οποίο υδρολύεται εύκολα από όλα τα είδη εστερασών. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα αποτελείται από ένα μόριο παρά-νιτροφαινόλης (pNP) εστεροποιημένο με ένα μόριο οξικού οξέος. Η εστεράση αναγνωρίζει και υδρολύει τον εστερικό δεσμό, απελευθερώνοντας την παρά-νιτροφαινόλη, η οποία λαμβάνει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, επιτρέποντας τον ποσοτικό της προσδιορισμό, δίνοντας μέγιστο απορρόφησης στα 410 nm.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6, 100 mM, όγκου 160 μL προστέθηκαν 20 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 20 μL διαλύματος pNPA, με διαλύτη το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 0,5 mM. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 200 μL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 35°C. Η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 410 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Η διάρκεια της αντίδρασης ήταν 20 min. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό για 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol παρά-νιτροφαινόλης (pNP) ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 6 και θερμοκρασία 35°C.

Καμπύλη αναφοράς

Για την ποσοτικοποίηση της παρά-νιτροφαινόλης που απελευθερώθηκε κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα pNP συγκεντρώσεων 0,02, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2,

και 0,3 mM, σε pH 6. Από κάθε διάλυμα παρελήφθησαν 200 μL , των οποίων η απορρόφηση ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 410 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, από όπου προέκυψε η εξίσωση: $C(\mu\text{M}) = 491,81 \text{ OD}$ ($R^2=0,999$).

2.2.2.3 Μέτρηση ενεργότητας β-ξυλοζιδάσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας της β-ξυλοζιδάσης χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside (pNPX), το οποίο αποτελείται από ένα μόριο πάρα-νιτροφαινόλης (pNP) και ένα μόριο β-D-ξυλοπυρανόζης, ενωμένων με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό, προσομοιάζοντας τη δομή της βασικής πολυμερικής αλυσίδας της ξυλάνης. Η β-ξυλοζιδάση αναγνωρίζει και υδρολύει τον β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό, απελευθερώνοντας την πάρα-νιτροφαινόλη, η οποία λαμβάνει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, επιτρέποντας τον ποσοτικό της προσδιορισμό, δίνοντας μέγιστο απορρόφησης στα 410 nm.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών pH 5,5, 100 mM, όγκου 160 μL προστέθηκαν 20 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 20 μL υδατικού διαλύματος pNPX, τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 0,5 mM. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 200 μL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 35°C. Η διάρκεια της αντίδρασης ήταν 10 min, μετά το πέρας των οποίων πραγματοποιήθηκε προσθήκη 40 μL διαλύματος Na_2CO_3 1M σε κάθε όγκο αντίδρασης. Η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε, κατόπιν, στα 410 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό για 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol πάρα-νιτροφαινόλης (pNP) ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 5,5 και θερμοκρασία 35°C.

Καμπύλη αναφοράς

Για την ποσοτικοποίηση της πάρα-νιτροφαινόλης που απελευθερώθηκε κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα pNP συγκεντρώσεων 0,01, 0,02, 0,05, 0,07, 0,1, και 0,15 mM, σε pH 5,5. Από κάθε διάλυμα παρελήφθησαν 200 μL , στα οποία προστέθηκαν από 40 μL διαλύματος Na_2CO_3 1M. Η απορρόφηση ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 410 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, από όπου προέκυψε η εξίσωση: $C(\mu\text{M}) = 156,61 \text{ OD}$ ($R^2=0,999$).

2.2.2.4 Μέτρηση ενεργότητας λακκάσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των λακκασών χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό υπόστρωμα ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)). Το συνθετικό αυτό υπόστρωμα οξειδώνεται από τις λακκάσες και αποκτά χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα, δίνοντας μέγιστο απορρόφησης στα 420 nm. Το ABTS θεωρείται χαρακτηριστικό υπόστρωμα των λακκασών, καθώς προσομοιάζει τη δομή της λιγνίνης, η οποία δεν είναι πλήρως προσδιορισμένη.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών pH 4,5, 100 mM, όγκου 200 μL προστέθηκαν 25 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 25 μL υδατικού διαλύματος ABTS, τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 2 mM. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 250 μL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 35°C. Η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 420 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Η διάρκεια της αντίδρασης ήταν 10 min. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις.

Για τον υπολογισμό των Unit του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε ο νόμος των Lambert-Beer, ο οποίος συσχετίζει την απορρόφηση της αντίδρασης οξειδωσης, σε καθορισμένο χρόνο, με τη συγκέντρωση της οξειδωμένης ουσίας:

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

όπου A = η απορρόφηση του δείγματος

ε = ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας ($M^{-1}cm^{-1}$)

b = η απόσταση της διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα στο δείγμα (cm)

c = η συγκέντρωση της ουσίας (M)

Σημειώνεται ότι το μέγεθος b λαμβάνει την τιμή 0,67 cm όταν οι μετρήσεις της απορρόφησης πραγματοποιούνται στο microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices) και ο αντιδρών όγκος ισούται με 250 μL. Για το ABTS, ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας είναι $\varepsilon_{420} = 3,6 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την οξείδωση 1 μmol ABTS ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 4,5 και θερμοκρασία 35°C.

2.2.2.5 Μέτρηση ενεργότητας οξειδάσης των αρυλ-αλκοολών

Η μέτρηση της ενεργότητας των οξειδασών των αρυλ-αλκοολών πραγματοποιήθηκε μέσω της έμμεσης φωτομετρικής ανίχνευσης του H_2O_2 που απελευθερώνεται κατά την οξειδοαναγωγική αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα, ως υπόστρωμα του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η 3,4-διμεθοξυβενζυλική αλκοόλη ή βερατρυλική αλκοόλη, η οποία οξειδώνεται σε βερατραλδεΐδη, με ταυτόχρονη απελευθέρωση H_2O_2 . Για την

ανίχνευση του H_2O_2 χρησιμοποιήθηκε το σύστημα υπεροξειδάσης του χρένου (horseradish peroxidase, HRP) – ερυθρού της φαινόλης (phenol red). Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι η HRP μπορεί να εμφανίσει καταλυτική δράση μόνο παρουσία H_2O_2 και να οξειδώσει το ερυθρό της φαινόλης, το χρώμα του οποίου, τότε, μεταβάλλεται από ερυθρό σε ιώδες, εμφανίζοντας μέγιστο απορρόφησης στα 610 nm.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6, 100 mM, όγκου 158 μ L προστέθηκαν 20 μ L ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 20 μ L υδατικού διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης, τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 5 mM. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 198 μ L και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 35°C, ενώ είχε διάρκεια 15 min. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 22 μ L διαλύματος HRP-phenol red σε κάθε αντιδρών όγκο, τελικής συγκέντρωσης 60 μ g/mL και 100 μ g/mL, αντίστοιχα. Έτσι, ο τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος αυξήθηκε στα 220 μ L και πραγματοποιήθηκε επώαση σε σταθερή θερμοκρασία 35°C για 5 min, μετά το πέρας των οποίων προστέθηκαν 30 μ L διαλύματος NaOH 1N σε κάθε αντίδραση, για τον τερματισμό της. Η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 610 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση. Επιπλέον, για τον αποκλεισμό άλλων παραγόντων του ενζυμικού διαλύματος που μπορεί να οξειδώνουν το ερυθρό της φαινόλης, οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν και σε αντιδράσεις ίδιας σύστασης αλλά με αντικατάσταση της βερατρυλικής αλκοόλης με απιονισμένο νερό. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μ mol H_2O_2 ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 6 και θερμοκρασία 35°C.

Καμπύλη αναφοράς

Για την ποσοτικοποίηση του H_2O_2 που απελευθερώθηκε κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα H_2O_2 συγκεντρώσεων 1, 5, 10, 20, 50 και 70 μ M, σε pH 6. Από κάθε διάλυμα παρελήφθησαν 198 μ L, στα οποία προστέθηκαν από 22 μ L HRP-phenol red, τελικής συγκέντρωσης 60 μ g/mL και 100 μ g/mL, αντίστοιχα, και επώαστηκαν για 5 min σε σταθερή θερμοκρασία 35°C. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος προστέθηκαν 30 μ L διαλύματος NaOH 1N σε κάθε αντίδραση και μετρήθηκε, κατόπιν, η απορρόφηση ακτινοβολίας στα 610 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, από όπου προέκυψε η εξίσωση: $C(\mu\text{M}) = 95,47 \text{ OD}$ ($R^2=0,999$).

2.2.2.6 Μέτρηση ενεργότητας κυτταρινάσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των κυτταρινασών χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (Carboxymethylcellulose sodium, CMC) (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.) και προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων που προκύπτουν κατά την υδρόλυσή του, μέσω της μεθόδου δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.2.3.1.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών pH 5,5, 100 mM, όγκου 200 mL προστέθηκαν 50 mL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 250 mL υδατικού διαλύματος CMC τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 5 g/L (0,5% w/v). Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 500 mL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 45°C, υπό ανάδευση 1100 rpm, και είχε διάρκεια 30 min. Στη συνέχεια, τα αντιδρώντα συστήματα φυγοκεντρήθηκαν για 2 min και ακολούθησε η μέθοδος DNS.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol γλυκόζης ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 5,5 και θερμοκρασία 45°C.

Σημειώνεται πως για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με αύξηση του pH μέσω της προσθήκης του αντιδραστήριου DNS πριν την έναρξη της αντίδρασης.

2.2.2.7 Μέτρηση ενεργότητας εστεράσης του οξικού οξέος

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των εστερασών του οξικού οξέος χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα ακετυλιωμένης ξυλάνης (Megazyme, Ιρλανδία) και ποσοτικοποίηση του οξικού οξέος που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυσή του, μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.2.3.2.1.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS pH 6, 100 mM, όγκου 400 mL προστέθηκαν 100 mL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 500 mL υδατικού διαλύματος ακετυλιωμένης ξυλάνης ξύλου σημόδας τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 5 g/L (0,5% w/v). Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν το 1 mL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 40°C, υπό ανάδευση 1100 rpm, και είχε διάρκεια 3 h. Στη συνέχεια, τα αντιδρώντα συστήματα οδηγήθηκαν σε βρασμό για 15 min, φυγοκεντρήθηκαν και ετοιμάστηκαν για τη χρωματογραφική ανάλυση. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις, ενώ η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και για το τυφλό διάλυμα (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol οξικού οξέος ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 6 και θερμοκρασία 40°C.

2.2.2.8 Μέτρηση ενεργότητας γλυκουρονικής εστεράσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των γλυκουρονικών εστερασών χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό κιτ K-GEUX3 (Glucuronoyl esterase assay procedure) της εταιρίας Megazyme (Ιρλανδία).

Αρχή της Μεθόδου

Η μέτρηση της ενεργότητας του συγκεκριμένου ενζύμου μέσω του κιτ βασίζεται σε ένα διαλυτό χρωμογόνο υπόστρωμα, σε συνδυασμό με δύο βοηθητικά ένζυμα: μία α-γλυκουρονιδάση GH67 και μία β-ξυλοζιδάση GH43. Το χρωματομετρικό υπόστρωμα του κιτ αποτελείται από ένα μόριο πάρα-νιτροφαινόλης (pNP) συνδεδεμένο με ένα αλδοτριουρονικό οξύ, το οποίο διαθέτει έναν μεθυλεστέρα στην καρβοξυλική ομάδα του υπολείμματος γλυκουρονικού οξέος. Μετά την υδρόλυση της ομάδας μεθυλεστέρα από μία γλυκουρονική εστεράση, ακολουθεί η διαδοχική υδρολυτική δράση της α-γλυκουρονιδάσης και της β-ξυλοζιδάσης, με αποτέλεσμα της απελευθέρωσης της πάρα-νιτροφαινόλης, η οποία παρουσιάζει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, ύστερα από προσθήκη διαλύματος φωσφορικού τρινατρίου (pH 12). Ο ρυθμός απελευθέρωσης της pNP σχετίζεται άμεσα με τον ρυθμό υδρόλυσης του υποστρώματος από τη γλυκουρονική εστεράση που αναλύεται. Η ομάδα μεθυλεστέρα του υποστρώματος δρα τόσο ως ομάδα «αναγνώρισης» για την υδρόλυση από τη γλυκουρονική εστεράση, όσο και ως ομάδα «αποκλεισμού» της υδρόλυσης από τη βοηθητική α-γλυκουρονιδάση.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε 50 μL αντιδρώντος διαλύματος GEUX3 (το οποίο περιέχει το υπόστρωμα, την α-γλυκουρονιδάση και τη β-ξυλοζιδάση, διαλυμένα σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0,01 mM, pH 6,5, που περιέχει αζίδιο του νατρίου 0,02% w/v), προστίθενται 50 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 100 μL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 40°C, και είχε διάρκεια 10 min. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 1,5 mL διαλύματος φωσφορικού τρινατρίου 2% w/v pH 12 σε κάθε αντιδρών όγκο και ακολούθησε ανάδευση. Στη συνέχεια, λήφθηκαν 250 μL από κάθε διάλυμα αντίδρασης και οδηγήθηκαν προς φωτομέτρηση. Η απορρόφηση ακτινοβολίας των διαλυμάτων αυτών μετρήθηκε στα 400 nm, με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices). Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol πάρα-νιτροφαινόλης ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 6,5 και θερμοκρασία 40°C.

Για τον υπολογισμό των Unit του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε ο νόμος των Lambert-Beer. Δίνεται για την πάρα-νιτροφαινόλη, σε διάλυμα φωσφορικού νατρίου 2% w/v pH 12, για φωτομέτρηση στα 400 nm: $\epsilon_{400}=18,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.2.2.9 Μέτρηση ενεργότητας αραβινοφουρανοζιδάσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των αραβινοφουρανοζιδασών χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα αραβινοξυλάνης σίκαλης (Megazyme, Ιρλανδία) και ποσοτικοποίηση της αραβινόζης, αλλά και άλλων σακχάρων που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυσή του, μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.2.3.2.2. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το σύνολο των αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώθηκαν κατά την υδρόλυση μέσω της μεθόδου δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.2.3.1.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS pH 6, 100 mM, όγκου 400 μL προστέθηκαν 100 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 500 μL υδατικού διαλύματος αραβινοξυλάνης σίκαλης τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 5 g/L (0,5% w/v). Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν το 1 mL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 45°C, υπό ανάδευση 1100 rpm, και είχε διάρκεια 4 h. Στη συνέχεια, τα αντιδρώντα συστήματα οδηγήθηκαν σε βρασμό για 15 min, φυγοκεντρήθηκαν και ετοιμάστηκαν για τη χρωματογραφική ανάλυση. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις, ενώ η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και για το τυφλό διάλυμα (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol αραβινόζης ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 6 και θερμοκρασία 45°C.

2.2.2.10 Μέτρηση ενεργότητας εστεράσης του φερουλικού οξέος

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των εστερασών του φερουλικού οξέος χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα μεθυλικού εστέρα του φερουλικού οξέος (methyl ferulate) και ποσοτικοποίηση του φερουλικού οξέος που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυσή του μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.2.3.2.3.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS pH 6, 100 mM, όγκου 750 μL προστέθηκαν 100 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 50 μL διαλύματος μεθυλικού εστέρα του φερουλικού οξέος, με διαλύτη το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 1 mM. Προστέθηκαν, επίσης, 100 μL υδατικού διαλύματος αζιδίου του νατρίου (NaN₃) τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 1 mM, με στόχο τη διακοπή της ροής των ηλεκτρονίων και, συνεπώς, της δράσης των οξειδοαναγωγικών ενζύμων. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν το 1 mL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 40°C, υπό ανάδευση 1100 rpm, και είχε διάρκεια 2 h. Στη συνέχεια, τα αντιδρώντα συστήματα οδηγήθηκαν σε βρασμό για 15 min, φυγοκεντρήθηκαν και ετοιμάστηκαν για τη χρωματογραφική ανάλυση. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις, ενώ η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και για το τυφλό διάλυμα (blank), το οποίο είχε σύσταση

ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol φερουλικού οξέος ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 6 και θερμοκρασία 40°C.

2.2.2.11 Μέτρηση ενεργότητας ευέλικτης υπεροξειδάσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των ευέλικτων υπεροξειδασών χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό υπόστρωμα Reactive Black 5 (tetrasodium 4-amino-5-hydroxy-3,6-bis((4-((2-(sulphonatooxy)ethyl)sulphonyl)phenyl)azo)naphthalene-2,7-disulphonate). Το υπόστρωμα αυτό αποτελεί μία βαφή με χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα, το οποίο δίνει μέγιστο απορρόφησης στα 558 nm, ενώ όταν οξειδώνεται αποχρωματίζεται.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών pH 5,5 όγκου 212,5 μL προστέθηκαν 25 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 12,5 μL υδατικού διαλύματος Reactive Black 5, τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 50 μM . Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 250 μL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 35°C. Η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 558 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Η διάρκεια της αντίδρασης ήταν 15 min. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις.

Για τον υπολογισμό των Unit του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε ο νόμος των Lambert-Beer. Δίνεται ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του Reactive Black 5: $\epsilon_{558}=50 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την οξείδωση 1 μmol Reactive Black 5 ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 5,5 και θερμοκρασία 35°C.

2.2.2.12 Μέτρηση ενεργότητας οξειδάσης της γαλακτόζης

Η μέτρηση της ενεργότητας των οξειδασών της γαλακτόζης πραγματοποιήθηκε μέσω της έμμεσης φωτομετρικής ανίχνευσης του H_2O_2 που απελευθερώνεται κατά την οξειδοαναγωγική αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα, ως υπόστρωμα του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η γαλακτόζη, η οποία οξειδώνεται, με ταυτόχρονη απελευθέρωση H_2O_2 . Για την ανίχνευση του H_2O_2 χρησιμοποιήθηκε το σύστημα υπεροξειδάσης του χρένου (horseradish peroxidase, HRP) – ερυθρού της φαινόλης (phenol red).

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6 όγκου 158 μL προστέθηκαν 20 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 20 μL υδατικού διαλύματος γαλακτόζης, τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 5 mM. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 198 μL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 35°C, ενώ είχε διάρκεια 15 min. Μετά

το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 22 μL διαλύματος HRP-phenol red σε κάθε αντιδρών όγκο, τελικής συγκέντρωσης 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, αντίστοιχα. Έτσι, ο τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος αυξήθηκε στα 220 μL και πραγματοποιήθηκε επώαση σε σταθερή θερμοκρασία 35°C για 5 min, μετά το πέρας των οποίων προστέθηκαν 30 μL διαλύματος NaOH 1N σε κάθε αντίδραση, για τον τερματισμό της. Η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 610 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση. Επιπλέον, οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν και σε αντιδράσεις ίδιας σύστασης αλλά με αντικατάσταση της γαλακτόζης με απιονισμένο νερό. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol H_2O_2 ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 6 και θερμοκρασία 35°C.

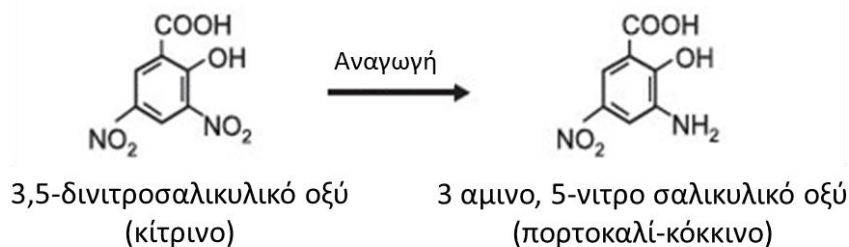
Για την ποσοτικοποίηση του H_2O_2 που απελευθερώθηκε χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η κατασκευή της οποίας περιγράφηκε στην Ενότητα 2.2.2.5.

2.2.3 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης προϊόντων ενζυμικής δράσης

2.2.3.1 Προσδιορισμός των συνολικών αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)

Η φωτομετρική μέθοδος του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) παρέχει μια ταχεία και απλή εκτίμηση της συνολικής ποσότητας των αναγωγικών σακχάρων σε ένα διάλυμα. Ως αναγωγικό σάκχαρο ορίζεται το σάκχαρο εκείνο που έχει ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο.

Η μέθοδος βασίζεται στον σχηματισμό συμπλόκου (3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ) ανάμεσα στο ημιακεταλικό υδροξύλιο και το δινιτροσαλικυλικό οξύ, σε αλκαλικό διάλυμα, κατά τη θέρμανση σε θερμοκρασία ανώτερη των 70°C. Το σύμπλοκο αυτό εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540 nm, με το χρώμα της αντίδρασης να αλλάζει από κίτρινο σε πορτοκαλί ή κόκκινο, ανάλογα με τη συγκέντρωση των υπαρχόντων αναγωγικών σακχάρων.



Εικόνα 19. Η αντίδραση αναγωγής του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος σε 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ υπό θέρμανση, σε αλκαλικές συνθήκες, με συνοδεία μεταβολής του χρώματος του δείγματος από κίτρινο σε πορτοκαλί-κόκκινο

https://biocyclopedia.com/index/biotechnology_methods/biochemistry/estimation_of_reducing_sugars_by_the_dinitro_salicylic_acid_dns_method.php

Το αντιδραστήριο DNS παρασκευάζεται με αραιώση 200 mL διαλύματος NaOH 8% w/v σε 500 mL dH₂O και διάλυση 10 g άνυδρου δινιτροσαλικυλικού οξέος. Κατόπιν, προστίθενται 402,7 g τρυγικό καλιονάτριο (potassium sodium tartarate) υπό ήπια θέρμανση και ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου και ο όγκος του συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό έως 1 L.

Μέθοδος

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθενται 50 μL αντιδραστηρίου DNS και 50 μL δείγματος. Οι σωλήνες αναδεύονται με Vortex και οδηγούνται σε βρασμό, για 5 min, και, στη συνέχεια, προστίθενται 400 μL dH₂O σε κάθε σωλήνα. Ακολουθεί ανάδευση με Vortex. Κατόπιν, λαμβάνονται 250 μL από το προκύπτον διάλυμα αντίδρασης του εκάστοτε δοκιμαστικού σωλήνα, και οδηγούνται προς φωτομέτρηση. Η απορρόφηση των διαλυμάτων αυτών μετρείται στα 540 nm, με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices). Σημειώνεται, πως ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο αντί για 50 μL δείγματος περιέχει 50 μL dH₂O, ενώ για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται διπλές μετρήσεις για εξασφάλιση μεγαλύτερης αξιοπιστίας.

Καμπύλη αναφοράς

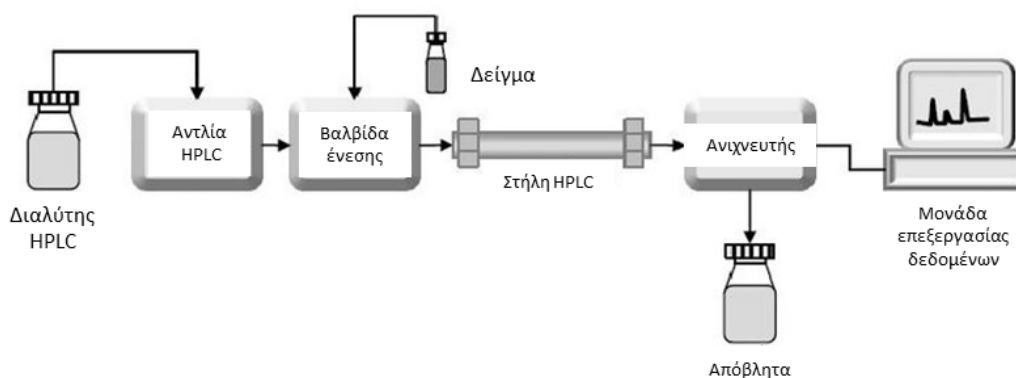
Για την ποσοτικοποίηση των αναγωγικών σακχάρων, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το εμπορικό σάκχαρο D-(+)-ξυλόζη (Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.). Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε για υδατικά διαλύματα ξυλόζης συγκεντρώσεων 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8 και 2,0 mg/mL, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, από όπου προέκυψε η εξίσωση: $C(\mu\text{M}) = 13866 \text{ OD}$ ($R^2=0,999$).

2.2.3.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Οι χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού εφαρμόζονται ευρύτατα για τη διαπίστωση της παρουσίας ή μη συστατικών σε μίγματα τα οποία περιέχουν έναν περιορισμένο αριθμό άλλων ουσιών/προσμίξεων, γνωστής, συνήθως, ταυτότητας. Η επιβεβαίωση της ταυτότητας των συστατικών του μίγματος προαπαιτεί τον

χρωματογραφικό διαχωρισμό αυτών, με σκοπό την απομόνωσή τους και την μετέπειτα ανάλυση των συστατικών αυτών με χημικές ή φασματοσκοπικές τεχνικές. Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση, στην οποία ένας διαλύτης ή σύστημα διαλυτών ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες ενός μίγματος μέσω μίας στατικής φάσης, η οποία αποτελείται από ένα πορώδες στερεό υλικό ή από υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών βασίζεται στον διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από φυσικοχημική συγγένεια του συστατικού με την κάθε φάση⁹³.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί μία μορφή χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και μειώνει σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για τον διαχωρισμό. Ένα τυπικό σύστημα HPLC απαρτίζεται από τις εξής μονάδες: δεξαμενή διαλύτη, αντλία, βαλβίδα ένεσης, στήλη, μονάδα ανιχνευτή και μονάδα επεξεργασίας δεδομένων, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 20.



Εικόνα 20. Διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Ανάλογα με τη σχέση της πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας HPLC: κανονικής και αντίστροφης φάσης. Στην HPLC κανονικής φάσης, η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο του πυριτίου ή του αργιλίου και είναι πολική, ενώ η κινητή φάση είναι μη πολική. Οι πολικές ενώσεις θα προσροφούνται ισχυρότερα στη στατική φάση και συνεπώς οι άπολες ενώσεις θα εκκλύονται πρώτες από τη στήλη. Στην HPLC αντίστροφης φάσης, η στατική φάση αποτελείται από προσροφητικό υλικό στην επιφάνεια του οποίου βρίσκονται προσδεμένες μακρίες αλυσίδες υδρογονάνθρακα, ενώ η κινητή φάση είναι πολική. Μη πολικά μόρια στο διαχωριζόμενο δείγμα προσροφούνται ισχυρά στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα, ενώ τα πολικά μόρια κινούνται ταχύτερα διαμέσου της στήλης και εκκλύονται πρώτα. Η χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή της HPLC. Γενικότερα, σε οποιοδήποτε διαχωρισμό, προπορεύονται τα μόρια ουσιών με πολικότητα αντίστοιχη της κινητής φάσης, ενώ καθυστερούν αυτά με πολικότητα αντίστοιχη της στατικής φάσης⁹³.

2.2.3.2.1 Μέθοδος για τη μέτρηση ενεργότητας των εστερασών του οξικού οξέος

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των εστερασών του οξικού οξέος, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πραγματοποιήθηκε με το σύστημα LC-20AD (Shimadzu), με χρήση της στήλης Aminex HPX-87H (Biorad), και με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης Shimadzu RID-10A (Hewlett-Packard Company). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διαλύτης θειικού οξέος 0,3 g/L με ροή 0,6 mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 50°C ενώ ο όγκος της ένεσης ορίστηκε 5 μ L. Κάθε ανάλυση διήρκησε 30 min.

Για την ποσοτικοποίηση του προϊόντος της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρότυπου διαλύματος οξικού οξέος συγκέντρωσης 2 mg/mL.

2.2.3.2.2 Μέθοδος για τη μέτρηση ενεργότητας των αραβινοφουρανοζιδασών

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των αραβινοφουρανοζιδασών, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πραγματοποιήθηκε με το σύστημα LC-20AD (Shimadzu), με χρήση της στήλης Aminex HPX-87P (Biorad), και με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης Shimadzu RID-10A (Hewlett-Packard Company). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υπερκάρθαρο νερό με ροή 0,6 mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 85°C ενώ ο όγκος της ένεσης ορίστηκε 5 μ L. Κάθε ανάλυση διήρκησε 30 min.

Για την ποσοτικοποίηση των προϊόντων της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρότυπου διαλύματος αραβινόζης 1 mg/mL, ξυλόζης 10 mM και ξυλοβιόζης 10 mM.

2.2.3.2.3 Μέθοδος για τη μέτρηση ενεργότητας των εστερασών του φερουλικού οξέος

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των εστερασών του φερουλικού οξέος, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πραγματοποιήθηκε με το σύστημα 1260 Infinity II (Agilent Technologies), με χρήση της στήλης C18 CC 250/4.6 Nucleosil 100-5 (Macherey-Nagel), και με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού UV-Vis ProStar 335 Diode Array Detector (Agilent Technologies), με μέτρηση στα 280 nm και στα 325 nm. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη 65% v/v με ροή 1 mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 40°C, ενώ ο όγκος της ένεσης ορίστηκε στα 20 μ L. Κάθε ανάλυση διήρκησε 10 min.

Για την ποσοτικοποίηση των προϊόντων της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρότυπου διαλύματος φερουλικού οξέος 0,1 mg/mL.

2.2.4 Υδρόλυση υποστρωμάτων με ενζυμικά συμπυκνώματα

Για την ολοκλήρωση της μελέτης του ενζυμικού δυναμικού των τριών στελεχών Βασιδιομυκήτων, ύστερα από την ανάπτυξή τους σε υγρή καλλιέργεια στελεχών αραβοσίτου, πραγματοποιήθηκαν εφαρμογές υδρόλυσης δύο διαφορετικών λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων μέσω χρήσης του ακατέργαστου ενζυμικού διαλύματος (crude) των καλλιεργειών αυτών, ύστερα από συμπύκνωση αυτού στον υποδεκαπλάσιο όγκο (10 φορές συμπύκνωση). Στις δοκιμές υδρόλυσης

χρησιμοποιήθηκε, επίσης, και το διάλυμα των απομονωμένων ενζύμων από το στέλεχος *P. citrinopileatus*, ύστερα από 8,3 φορές συμπύκνωση.

2.2.4.1 Προετοιμασία αντιδράσεων και επώαση

Για τις αντιδράσεις υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκαν δύο λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα: προκατεργασμένα στελέχη αραβοσίτου (corn stover) και προκατεργασμένο ξύλο οξιάς (Lignocel HBS 150/500, beechwood). Οι συνθήκες προκατεργασίας, καθώς και η σύσταση των υποστρωμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 4. Συνθήκες προκατεργασίας και σύσταση των προς υδρόλυση υποστρωμάτων

Βιομάζα	Προκατεργασία	Σύσταση
Στελέχη αραβοσίτου	Υδροθερμική προκατεργασία Οξικό Οξύ 0,3% v/v T=230°C/~15 min	Γλυκόζη: 47,14% Ξυλόζη: 6,87% Αραβινόζη: 1,51% Λιγνίνη: 32,43%
Ξύλο οξιάς	H ₂ O:Ακετόνη (50:50) P _{O₂} ,αρχική=16 bar T=150°C/~60 min	Κυτταρίνη: 57,52 % Ημικυτταρίνη: 22,63 % Λιγνίνη (αδιάλυτη σε οξύ): 12,63 % Λιγνίνη (διαλυτή σε οξύ): 3,48 g/L

Για την προετοιμασία των αντιδράσεων, σε ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών pH 5,5 όγκου 900 μL προστέθηκαν 100 μL ενζυμικού συμπυκνώματος και 50 mg στερεού υποστρώματος, τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 50 mg/mL. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν το 1 mL και οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 45°C, υπό ανάδευση 1200 rpm. Η επώαση διήρκησε 24 h. Στη συνέχεια, τα αντιδρώντα συστήματα φυγοκεντρήθηκαν προς απομάκρυνση της στερεής βιομάζας. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις, ενώ η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και για το τυφλό διάλυμα (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά το ένζυμο είχε απενεργοποιηθεί με βρασμό 20 min πριν προστεθεί στην αντίδραση.

2.2.4.2 Ανάλυση προϊόντων υδρόλυσης με HPLC

Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), ενώ, επιπλέον, προσδιορίστηκε το σύνολο των αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώθηκαν κατά την υδρόλυση μέσω της μεθόδου δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πραγματοποιήθηκε με το σύστημα LC-20AD (Shimadzu), με χρήση της στήλης Aminex HPX-87P (Biorad), και με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης Shimadzu RID-10A (Hewlett-Packard Company). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό με ροή 0,6 mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 85°C ενώ ο όγκος της ένεσης ορίστηκε 5 μL. Κάθε ανάλυση διήρκησε 30 min.

Για την ποσοτικοποίηση των προϊόντων της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων αραβινόζης 1 και 2 mg/mL, γαλακτόζης 1 και 2 mg/mL, γλυκόζης 1 και 2 mg/mL, ξυλόζης 1 και 2 mg/mL και ξυλοβιόζης 10 mM.

2.2.5 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Η μέθοδος Lowry αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ενός διαλύματος. Η μέθοδος βασίζεται στον σχηματισμό ενός συμπλόκου, σκούρου μπλε χρώματος, μεταξύ του χαλκού και δομών που διαθέτουν περισσότερους από δυο πεπτιδικούς δεσμούς, σε αλκαλικό περιβάλλον. Στη χρώση συμμετέχει και το βολφράμιο και ο μόλυβδος, που μέσω της αντίδρασης της φαινόλης, αντιδρούν με την τυροσίνη και την τρυπτοφάνη.

Για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτείται η παρασκευή των εξής διαλυμάτων:

- A. Υδατικό διάλυμα 1% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- B. Υδατικό διάλυμα 2% w/v $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- C. Υδατικό διάλυμα NaOH 0,2 M
- D. Υδατικό διάλυμα 4% w/v Na_2CO_3
- E. Διάλυμα αποτελούμενο από 9,8 mL C, 9,8 mL D, 0,2 mL A και 0,2 mL B.
- F. Υδατικό διάλυμα 50% αντιδραστηρίου φαινόλης Folin-Ciocalteu

Για μέτρηση με τη χρήση της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices), σε 250 μL φρέσκου διαλύματος E προστίθενται 50 μL δείγματος. Ακολουθεί ανάδευση και έπειτα το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Κατόπιν, προστίθενται 25 μL διαλύματος F. Ακολουθεί ανάδευση και έπειτα το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Στη συνέχεια, προσδιορίζεται η απορρόφηση του δείγματος στα 750 nm. Ως μηδενική απορρόφηση λαμβάνεται η απορρόφηση διαλύματος που στη θέση του δείγματος έχει προστεθεί απιονισμένο νερό.

Καμπύλη αναφοράς

Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε με τη χρήση της εμπορικής αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA). Η πρωτεΐνη διαλύθηκε σε απιονισμένο νερό και έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης πρωτεΐνης 0,05, 0,07, 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 και 1,0 mg/mL. Ακολούθησε η μέθοδος, όπως περιγράφεται παραπάνω. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, από όπου προέκυψε η εξίσωση: $C(\text{mg/mL}) = 0,8012 \text{ OD}$ ($R^2=0,995$).

2.2.6 Απομόνωση και καθαρισμός ενζύμων

Με βάση το ενζυμικό προφίλ των τριών στελεχών Βασιδιομυκήτων που μελετήθηκαν, επιλέχθηκε ο μύκητας *Abortiporus biennis* για την παραγωγή και τον καθαρισμό λακκασών. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας του μύκητα *Abortiporus biennis*, σε υπόστρωμα στελεχών αραβοσίτου. Το υγρό αυτό

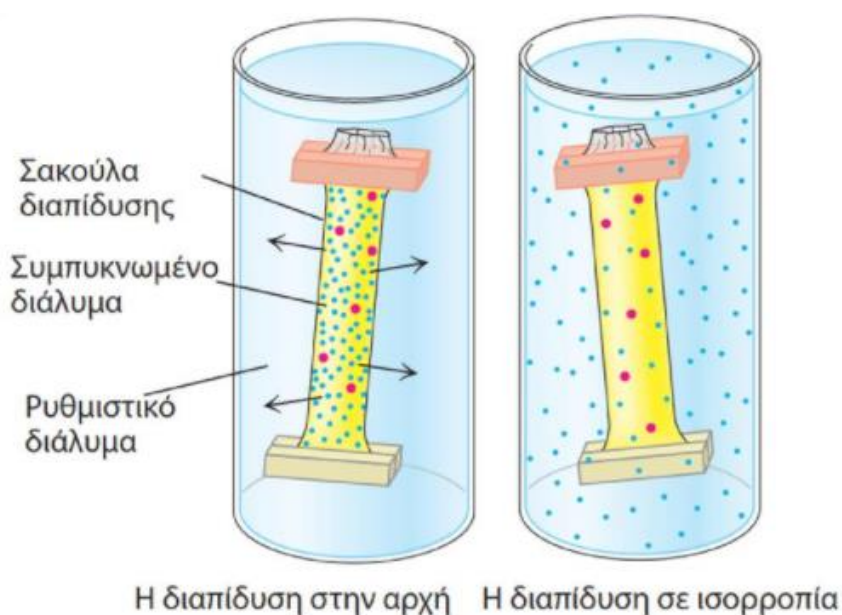
προήλθε από καλλιέργεια όγκου 500 mL. Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας πραγματοποιούταν δειγματοληψία 1 mL από το υπερκείμενο υγρό αυτής ανά δύο μέρες με σκοπό την παρακολούθηση της μεταβολής της ενεργότητας των λακκασών. Η μέτρηση της ενεργότητας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.2.2.4 με χρήση τόσο του υποστρώματος ABTS, όσο και της κατεχόλης. Για τον υπολογισμό των Unit χρησιμοποιήθηκε ο νόμος των Lambert-Beer, με συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας για το ABTS $\epsilon_{420} = 3,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και για την κατεχόλη $\epsilon_{450} = 928 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.2.6.1 Παραλαβή και συμπύκνωση υπερκείμενου υγρού καλλιέργειας

Μετά το πέρας της επώασης του μικροοργανισμού, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν, διηθήθηκαν και συμπυκνώθηκαν με τη συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.), όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 2.2.1.2. Αποτέλεσμα της συμπύκνωσης ήταν η μείωση του όγκου του υπερκείμενου υγρού από 350 mL σε 40 mL (8,75 φορές).

2.2.6.2 Εξισορρόπηση με διαπίδυση

Το επόμενο στάδιο μετά την συμπύκνωση του ενζυμικού διαλύματος, είναι η εξισορρόπηση του σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με τη μέθοδο της διαπίδυσης (dialysis). Η διαπίδυση αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στις αρχές της ώσμωσης. Σκοπός της μεθόδου είναι η απομάκρυνση διαλυμένων ουσιών μικρού μοριακού βάρους από ένα διάλυμα με τη χρήση ημιπερατών μεμβρανών. Ανάλογα με τα όρια μοριακής διαπερατότητας μιας πορώδους μεμβράνης διαπίδυσης, μόνο διαλυμένες ουσίες μικρού μοριακού βάρους μετακινούνται από περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης, μέσω της μεμβράνης, από το ένα διάλυμα στο άλλο, έως την αποκατάσταση δυναμικής ισορροπίας.



Εικόνα 21. Εξισορρόπηση με διαπίδυση. Τα μόρια της πρωτεΐνης (κόκκινο χρώμα) παραμένουν μέσα στη σακούλα διαπίδυσης, ενώ τα μικρά μόρια (μπλε χρώμα) διαχέονται διαμέσου της μεμβράνης από την περιοχή υψηλής συγκέντρωσης στην περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης.

Με τη μέθοδο της διαπίδυσης επιτυγχάνεται η εξισορρόπηση του πρωτεϊνικού διαλύματος σε ρυθμιστικό διάλυμα συμβατό με τα περαιτέρω βήματα του καθαρισμού. Για την εξισορρόπηση του ενζυμικού διαλύματος που περιείχε τις λακκάσες ενδιαφέροντος ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα. Αρχικά, η ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Da, Sigma-Aldrich) ενυδατώθηκε για 30 min σε απιονισμένο νερό θερμοκρασίας 100°C. Κατόπιν, το ενζυμικό διάλυμα τοποθετήθηκε εντός της ενυδατωμένης μεμβράνης, η οποία ασφαλίσθηκε στα άκρα της. Η ασφαλισμένη μεμβράνη βυθίστηκε εντός δοχείου που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 7,5, 20 mM, όγκου τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερο από αυτόν του υγρού προς εξισορρόπηση (5 L). Η μεμβράνη παρέμεινε στο ρυθμιστικό διάλυμα για 20 h, σε σταθερή θερμοκρασία 4°C.

2.2.6.3 Απομόνωση των λακκασών AbiLac1 και AbiLac2 με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Για την απομόνωση των δύο λακκασών επιλέχθηκε η μέθοδος της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην έλξη ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα σωματίδια και εφαρμόζεται για ενώσεις που μπορούν να ιονίζονται, όπως οξέα, βάσεις κ.λπ. καθώς και για ενώσεις που αντιδρούν με ιοντικές ομάδες, όπως οι πρωτεΐνες. Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Η στήλη ιοντοανταλλαγής αποτελείται από έναν ιοντοανταλλάκτη, όπως είναι η ρητίνη, ο οποίος διακρίνεται σε δύο τύπους ανάλογα με το φορτίο του: στον κατιοντοανταλλάκτη, ο οποίος φέρει αρνητικά φορτισμένες ομάδες, και στον ανιοντοανταλλάκτη, ο οποίος φέρει θετικά φορτισμένες ομάδες. Τα μόρια ουσιών, τα οποία υπό τις συνθήκες της χρωματογραφίας, φέρουν ουδέτερο ή ομώνυμο φορτίο με το πληρωτικό υλικό της στήλης εκκλούνται πρώτα, ενώ τα μόρια ουσιών που φέρουν φορτίο αντίθετο με του ιοντοανταλλάκτη εκκλούνται αργότερα. Οι ενώσεις που συγκρατήθηκαν στη στήλη εκκλούνται με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης άλατος, με τις ενώσεις που προσδέονται ισχυρά στη στήλη να απαιτούν υψηλότερες συγκεντρώσεις άλατος για να εκλουθούν.

Η επιλογή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος της στήλης καθορίζεται από το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Όταν το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης ισούται με το pH του συστήματος, τότε ο συνολικός αριθμός των αρνητικών φορτίων ισούται με τον αριθμό των θετικών φορτίων. Επομένως, η πρωτεΐνη δεν φέρει φορτίο και δεν μπορεί να προσδεθεί στη ρητίνη. Σε χαμηλότερες τιμές pH, η πρωτεΐνη είναι θετικά φορτισμένη και μπορεί να προσδεθεί σε ρητίνες εναλλαγής κατιόντων, ενώ σε υψηλότερες τιμές pH είναι αρνητικά φορτισμένη και μπορεί να προσδεθεί σε ρητίνες εναλλαγής ανιόντων. Για την αποφυγή συνθηκών κάτω από τις οποίες η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος δεσμεύεται πολύ ισχυρά ή πολύ ασθενώς στη στήλη, η καλύτερη επιλογή για τη διαδικασία καθαρισμού είναι ένα pH περίπου κατά μία μονάδα μικρότερο ή μεγαλύτερο του pI.

Στην περίπτωση των λακκασών, λόγω των όξινων τιμών που λαμβάνει, συνήθως, το ισοηλεκτρικό τους σημείο, επιλέχθηκε η χρήση χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής σε pH 7,5. Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε για τον σκοπό αυτό ήταν η Q-Sepharose.

Παρακάτω περιγράφονται τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση των δύο ενζύμων.

Παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα:

- (A) Ρυθμιστικό διάλυμα Bis-Tris 20 mM pH 7,5
- (B) Διάλυμα NaCl 1 M σε ρυθμιστικό διάλυμα Bis-Tris 20 mM pH 7,5

Ο όγκος της ρητίνης που χρησιμοποιήθηκε (column volume, CV) ήταν περίπου 100 mL και η ροή της κινητής φάσης ορίστηκε ίση με 4,8 mL/min.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε το πακετάρισμα και η εξισορρόπηση της στήλης. Για τον σκοπό αυτό, με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας Econo Gradient (Biorad, Η.Π.Α.), διαπέρασαν την ρητίνη περίπου 1000 mL υπερκάρθο νερό και, κατόπιν, 1000 mL ρυθμιστικού διαλύματος (A), με σταθερή ροή 4,8 mL/min.

Στη συνέχεια, έγινε φόρτωση του ενζυμικού δείγματος, όγκου 40 mL, στη στήλη με ροή 4,8 mL/min. Τονίζεται, πως το δείγμα αυτό είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί στο pH του ρυθμιστικού διαλύματος (A) μέσω διαπίδυσης, όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 2.2.6.2. Μετά την ολοκλήρωση της φόρτωσης του δείγματος, πραγματοποιήθηκε ροή ρυθμιστικού διαλύματος (A) 4,8 mL/min, με σκοπό την έκλυση των πρωτεϊνών που δεν προσδέθηκαν στην στήλη (μηδενικού ή θετικού φορτίου, η ανίχνευση των οποίων επιτεύχθηκε μέσω ανιχνευτή UV ακτινοβολίας (280 nm) Econo UV Monitor (Biorad, Η.Π.Α.). Η ροή συνεχίστηκε έως ότου η απορρόφηση διατηρήθηκε σταθερή για τουλάχιστον 20 min.

Ακολούθησε, κατόπιν, η έκλυση των προσδεμένων πρωτεϊνών. Για τον σκοπό αυτό, μέσω της αντλίας, ρυθμίστηκε το εξής πρόγραμμα:

1. Από 0 έως 60 min, ισοκρατική ροή 90% ρυθμιστικού διαλύματος (A) και 10% διαλύματος (B). Επομένως, η τελική συγκέντρωση του NaCl στην κινητή φάση είναι 100 mM.
2. Από 60 έως 140 min, βαθμίδωση της ροής από 10% (B) έως 25% (B). Επομένως, η τελική συγκέντρωση του NaCl στην κινητή φάση αυξάνεται σταδιακά από 100 mM σε 250 mM.
3. Από 140 έως 160 min, βαθμίδωση της ροής από 25% (B) έως 50% (B). Επομένως, η τελική συγκέντρωση του NaCl στην κινητή φάση αυξάνεται σταδιακά από 250 mM σε 500 mM.
4. Από 160 έως 180 min, ισοκρατική ροή διαλύματος NaCl 1 M (B) για καθαρισμό της στήλης.

Η διερχόμενη κινητή φάση συλλέχθηκε σε κλάσματα ανά 9,6 mL και σε αυτά προσδιορίστηκε ποιοτικά η ενεργότητα λακκάσης με τη χρήση κατεχόλης ως υπόστρωμα, προκειμένου να προσδιορισθεί σε ποια κλάσματα έχουν εκλουσθεί τα

ένζυμα που μας ενδιαφέρουν. Για τον σκοπό αυτό σε 200 mL ρυθμιστικού διαλύματος Κιτρικού-Φωσφορικών pH 4,5 προστέθηκαν 25 mL από το κάθε κλάσμα και 25 mL υδατικού διαλύματος κατεχόλης, τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 5 mM. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 250 mL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 40°C για 10 min. Η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 450 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κλασματοσυλλέκτη (Advantec SF-2120 Super Fraction Collector).

Τα κλάσματα, στα οποία ανιχνεύτηκε υψηλή ενεργότητα λακκάσης, ενώθηκαν και αποθηκεύτηκαν ξεχωριστά. Αφού προσδιορίστηκε η πρωτεϊνική συγκέντρωσή τους μέσω της μεθόδου Lowry (Ενότητα 2.2.5) καθώς και η ενεργότητα λακκάσης με χρήση της κατεχόλης ως υπόστρωμα, τα κλάσματα οδηγήθηκαν σε συμπύκνωση με τη συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.), καθώς και με τη χρήση φυγοκεντρικών μεμβρανών υπερδιήθησης Amicon με τη βοήθεια της φυγοκέντρου Rotanta 460R, Hettich (Γερμανία).

Για τον καθαρισμό της στήλης από πρωτεϊνικά κατάλοιπα, ακολούθησε διέλευση διαλύματος (B) και, στη συνέχεια διαλύματος, NaCl 2 M σε ρυθμιστικό διάλυμα Bis-Tris 20 mM pH 7,5, με ροή 4,8 mL/min, έως ότου καθαριστεί η ρητίνη. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε διέλευση υπερκάθαρου νερού με ροή 4,8 mL/min και, τέλος, διαλύματος αιθανόλης 20% με ροή 4,8 mL/min.

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 22.



Εικόνα 22. Σύστημα χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής. Από αριστερά προς τα δεξιά: Ανιχνευτής UV, Αντλία, Στήλη, Μίκτης

2.2.6.4 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των ενζύμων, αλλά και για τον έλεγχο της καθαρότητάς τους, χρησιμοποιήθηκαν δύο ηλεκτροφορητικές τεχνικές, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω.

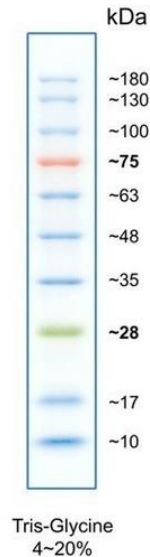
2.2.6.4.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες αποτελεί μία ευρύτατα διαδεδομένη μέθοδο για τον διαχωρισμό πρωτεϊνικών μορίων, καθώς και για τον έλεγχο της καθαρότητας πρωτεϊνικών δειγμάτων. Το πήκτωμα προκύπτει από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου σε μακριές αλυσίδες αλλά και σε εγκάρσιες διακλαδώσεις, ο οποίος πραγματοποιείται με την προσθήκη καταλύτη (υπερθειικό αμμώνιο, APS) και ενεργοποιητή (*N,N,N,N'*-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη, TEMED).

Ως αποδιατακτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), ένα ανιονικό απορρυπαντικό, και η β-μερκαπτοαιθανόλη, η οποία ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που σταθεροποιούν την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση. Το SDS προσδένεται στα υδρόφοβα τμήματα της πρωτεΐνης, διαλύοντας την τριτοταγή της δομή, ώστε διατηρείται στο διάλυμα της σε διαμόρφωση χαμηλότερης οργάνωσης. Το σύμπλεγμα του SDS με την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη αποκτά σημαντικό αρνητικό φορτίο, που είναι ανάλογο με τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης, ενώ το φορτίο της αρχικής φυσικής δομής καθίσταται αμελητέο. Ως αποτέλεσμα, η μοριακή μάζα του συμπλόκου SDS-πρωτεΐνης είναι ανάλογη με το μέγεθος και κατ' επέκταση με το μήκος της αλυσίδας. Με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού, η αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη κινείται εντός της πηκτής, με κατεύθυνση από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο, με τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια πρωτεΐνης να κινούνται ταχύτερα, και να ακολουθούν τα μεγαλύτερα.

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

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis System (Biorad, Η.Π.Α.), καθώς και το πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon Genetics Europe), για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των προς ανάλυση πρωτεϊνικών μορίων.



Εικόνα 23. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών BlueStar Prestained Protein Marker

Προετοιμασία συστήματος - Παρασκευή πηκτώματος

Για την ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE παρασκευάστηκε πήκτωμα που αποτελούταν από δύο τμήματα: το πήκτωμα διαχωρισμού και το πήκτωμα επιστοίβασης. Η σύσταση των επιμέρους πηκτωμάτων, για την παρασκευή ενός ολικού πηκτώματος, περιγράφεται στον Πίνακα 5. Για τη σταθεροποίηση των δύο πηκτωμάτων χρησιμοποιήθηκε ζεύγος ειδικών γυάλινων πλακών που στερεώθηκαν με τη βοήθεια μεταλλικών σφικτήρων σε κάθετη θέση με τη βοήθεια κατάλληλης βάσης. Αρχικά, ο χώρος ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες πληρώθηκε κατά τα 3/4 με το μίγμα του πηκτώματος διαχωρισμού και αφέθηκε περίπου 20-30 min μέχρις ότου να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός. Στη συνέχεια, ο κενός χώρος πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού πληρώθηκε με το πήκτωμα επιστοίβασης, στο οποίο τοποθετήθηκε ειδικό χτενάκι για το σχηματισμό «πηγαδιών» φόρτωσης των δειγμάτων, και αφέθηκε να πολυμεριστεί. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού αυτού, το σύστημα των γυάλινων πλακών τοποθετήθηκε στη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστέθηκαν περίπου 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης (Running buffer) και αφαιρέθηκαν τα χτενάκια.

Πίνακας 5. Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού και πηκτώματος επιστοίβασης για ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE

Πήκτωμα Διαχωρισμού (Resolving Gel) 12,5%		Πήκτωμα Επιστοίβασης (Stacking Gel)	
Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)	Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
dH ₂ O	1750	dH ₂ O	1500
0,75 M Tris, 0,2% w/v SDS (pH 8,8)	4700	0,25 M Tris, 0,2% w/v SDS (pH 6,8)	1900
40% bis- acrylamide	2900	40% bis- acrylamide	380
TEMED	15	TEMED	10
10% w/v APS	90	10% w/v APS	30

Προετοιμασία δειγμάτων - Ηλεκτροφόρηση

Για την προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 20 μL από κάθε δείγμα με 7 μL ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος SDS-PAGE (Sample buffer), η σύσταση του οποίου περιγράφεται στον Πίνακα 3, και ακολούθησε βρασμός για 5-7 min. Στη συνέχεια, έγινε φόρτωση των δειγμάτων στα ειδικά «πηγαδάκια» του πηκτώματος επιστοίβασης, ενώ στο πήκτωμα τοποθετήθηκαν, επιπλέον, 7 μL πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους BlueStar Prestained Protein Marker. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση, αρχικά υπό διαφορά δυναμικού 50 V, έως ότου τα δείγματα φτάσουν την κορυφή του πηκτώματος διαχωρισμού, οπότε η διαφορά δυναμικού αυξήθηκε στα 100 V.

Χρώση του πηκτώματος και εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα απομακρύνθηκε από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίσθηκε σε διάλυμα χρώσης (Staining solution) για τουλάχιστον 30 min υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αποχρωματισμός του πηκτώματος με εμβάπτιση σε διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution) και διαδοχικές πλύσεις με αυτό μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό του πηκτώματος και την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών. Η σύσταση των δύο διαλυμάτων περιγράφεται στον Πίνακα 3.

2.2.6.4.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native-PAGE)

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων με στόχο τον εντοπισμό των πρωτεϊνικών ζωνών που εμφανίζουν ενεργότητα λακκάσης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Native-PAGE ηλεκτροφόρησης, η οποία δεν περιλαμβάνει αποδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων.

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε στα δείγματα παράλληλα με την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, με μόνη διαφορά την προετοιμασία των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 20 μL από κάθε δείγμα με 7 μL ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος Native ηλεκτροφόρησης (50% v/v γλυκερόλη, 0,1% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης), ενώ δεν ακολούθησε βρασμός. Η υπόλοιπη διαδικασία παρέμεινε ίδια με εκείνη που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.2.6.4.1.

Εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών

Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του ζυμογραφήματος, η οποία βασίζεται στην ανίχνευση των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί σε ένα πήκτωμα με βάση την ενεργότητά τους σε κάποιο υπόστρωμα. Για την ανίχνευση της ενεργότητας λακκάσης το πήκτωμα εμβαπτίστηκε σε 22,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος Κιτρικού-Φωσφορικών pH 4,5, στο οποίο προστέθηκαν 2,5 mL διαλύματος κατεχόλης 50 mM. Το πήκτωμα αφέθηκε για επώαση στους 40°C μέχρι την εμφάνιση των ζωνών, χαρακτηριστικού καστανού χρώματος.

2.2.7 Χαρακτηρισμός καθαρών πρωτεϊνών

Για τον χαρακτηρισμό των καθαρών ενζύμων, *AbiLac1* και *AbiLac2*, που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκε εύρεση των βέλτιστων συνθηκών καταλυτικής

δράσης, αξιολόγηση της ικανότητας οξειδωσης διάφορων υποστρωμάτων, μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα, προσδιορισμός των κινητικών σταθερών Michaelis-Menten, καθώς και μελέτη της θερμοκρασιακής τους σταθερότητας.

2.2.7.1 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης των απομονωμένων λακκασών χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στις αντιδράσεις υδατικό διάλυμα κατεχόλης με τελική συγκέντρωση 5 mM στον όγκο της αντίδρασης. Η οξειδωμένη μορφή του συγκεκριμένου υποστρώματος εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 450 nm.

Κατά τη δοκιμή ενεργότητας, σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH όγκου 400 μL προστέθηκαν 50 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης και 50 μL υδατικού διαλύματος κατεχόλης, τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 5 mM. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 500 μL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία. Η διάρκεια της αντίδρασης ήταν 10 min, μετά το πέρας των οποίων, 250 μL από κάθε όγκο αντίδρασης οδηγήθηκαν προς φωτομέτρηση. Η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 450 nm με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά αντί για ένζυμο είχε προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα ίσου όγκου. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις.

Ως μονάδα ενεργότητας 1 Unit ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την οξείδωση 1 μmol κατεχόλης ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, στις συνθήκες θερμοκρασίας και pH της αντίδρασης.

Για τον υπολογισμό των Unit χρησιμοποιήθηκε ο νόμος των Lambert-Beer, με συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας για την κατεχόλη: $\epsilon_{450} = 928 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Έπειτα, για κάθε ένζυμο εντοπίστηκε η μέγιστη ενεργότητα μεταξύ των συνθηκών και προσδιορίστηκε η υπολειπόμενη ενεργότητα ως ο επί τοις εκατό λόγος της ενεργότητας στη συγκεκριμένη συνθήκη προς τη μέγιστη ενεργότητα που παρατηρήθηκε.

2.2.7.1.1 Εύρεση βέλτιστου pH δράσης

Η τιμή pH στην οποία το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη δράση μελετήθηκε για το εύρος τιμών pH από 3 έως 9, με τη χρήση του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (Κιτρικού-Φωσφορικών, Φωσφορικών ή Tris-HCl). Η σύσταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφεται στον Πίνακα 2.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω, με επώαση εντός της συσκευής φωτομέτρησης, υπό σταθερή θερμοκρασία 35°C.

2.2.7.1.2 Εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης

Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των δύο ενζύμων διερευνήθηκε για το εύρος θερμοκρασιών από 30 έως 70°C. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν όπως

περιγράφεται παραπάνω, με επώαση υπό ανάδευση 1200 rpm εντός θερμαινόμενων επωαστήρων Eppendorf Thermomixer Comfort στις μελετώμενες θερμοκρασίες, με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος με τη βέλτιστη τιμή pH για κάθε ένζυμο.

2.2.7.2 Αξιολόγηση οξειδωσης υποστρωμάτων

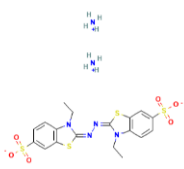
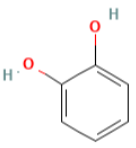
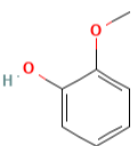
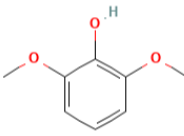
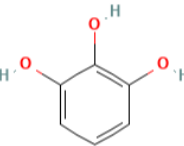
Η αξιολόγηση της ικανότητας οξειδωσης υποστρωμάτων από τα απομονωμένα ένζυμα αφορά στον ποιοτικό προσδιορισμό της ύπαρξης, ή μη, ενεργότητας ως προς τα υποστρώματα που εξετάζονται, μέσω της λήψης ενός φάσματος απορροφήσεων σε ένα εύρος μηκών κύματος από 220 έως 800 nm. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε η συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices).

Αρχικά, επιλέχθηκαν τα προς εξέταση υποστρώματα και παρασκευάστηκαν διαλύματά τους, συγκέντρωσης 20 mM. Κατόπιν, προετοιμάστηκαν οι αντιδράσεις με τις λακκάσες, όπου σε 200 μ L ρυθμιστικού διαλύματος με τη βέλτιστη τιμή pH για κάθε ένζυμο προστέθηκαν 25 μ L ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραίωσης και 25 μ L διαλύματος υποστρώματος, με τελική συγκέντρωση στον αντιδρών όγκο 2 mM. Η επώαση των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε στους 35°C, ενώ λήφθηκαν μετρήσεις στους χρόνους 0, 6 h και 24 h. Ως μηδενική απορρόφηση θεωρείται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank) το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά αντί για ένζυμο είχε προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα ίσου όγκου.

2.2.7.3 Μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα

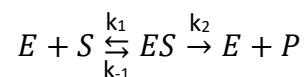
Για τη διερεύνηση της εξειδικευμένης δράσης των λακκασών *AbiLac1* και *AbiLac2* πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε ένα εύρος υποστρωμάτων, γνωστού συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας (ϵ) και προσδιορίστηκε η ενεργότητα των ενζύμων κατά την οξείδωση των υποστρωμάτων αυτών. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στη βέλτιστη τιμή pH για κάθε ένζυμο και με επώαση στη βέλτιστη θερμοκρασία, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των υποστρωμάτων συγκέντρωσης 50 mM, με εξαίρεση το διάλυμα του ABTS που είχε συγκέντρωση 20 mM. Στη συνέχεια, σε 200 μ L ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλου pH προστέθηκαν 25 μ L ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραίωσης και 25 μ L διαλύματος υποστρώματος, με τελική συγκέντρωση στον αντιδρών όγκο 5 mM (2 mM για το ABTS). Η επώαση των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε για 10 min και η μέτρηση της απορρόφησης έγινε με τη συσκευή φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Τα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα, καθώς και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας και το μήκος κύματος στο οποίο εμφανίζει μέγιστο το προϊόν οξείδωσης, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Υποστρώματα για τη μελέτη εξειδίκευσης των απομονωμένων ενζύμων *AbiLac1* και *AbiLac2*

Υπόστρωμα	Χημική Δομή	Συντελεστής Μοριακής Απορροφητικότητας, ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	Μήκος Κύματος Απορρόφησης Προϊόντος Οξειδωσης, λ (nm)
ABTS		36000	420
Κατεχόλη		928	450
Γουαϊακόλη		12100	456
2,6-DMP		27500	469
Πυρογαλλόλη		3724	420

2.2.7.4 Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten

Σύμφωνα με το μοντέλο των Michaelis-Menten το ένζυμο (E) αντιδρά με το υπόστρωμα (S) σχηματίζοντας το ενδιάμεσο σύμπλοκο ES, το οποίο, στη συνέχεια, είτε θα ξαναδώσει E και S είτε θα προχωρήσει προς σχηματισμό ενός προϊόντος (P):



Γίνεται η παραδοχή ότι η διάσπαση του ES οδηγεί στον σχηματισμό του προϊόντος δίχως τη δυνατότητα επανασχηματισμού του ES, το οποίο εξασφαλίζεται για πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις του προϊόντος από το υπόστρωμα. Επιπλέον, δεχόμαστε ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου ES δεν αλλοιώνει σημαντικά τη συγκέντρωση του υποστρώματος S, επομένως αναφερόμαστε σε μεγάλη περίσσεια υποστρώματος σε σχέση με το ένζυμο. Τέλος, θεωρούμε ότι το σύμπλοκο ES βρίσκεται σε συνθήκες μόνιμης κατάστασης, με την ταχύτητα σχηματισμού του να είναι ίση με την ταχύτητα εξαφάνισής του.

Η εξίσωση Michaelis – Menten ορίζεται ως εξής:

$$v = \frac{v_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

όπου v : η ταχύτητα της δράσης

v_{max} : η μέγιστη ταχύτητα

$[S]$: η συγκέντρωση του υποστρώματος

K_M : η σταθερά Michaelis – Menten

Η σταθερά Michaelis – Menten ορίζεται από τη σχέση:

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

όπου k_1 : η σταθερά ταχύτητας σχηματισμού του συμπλόκου ES

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

k_2 (k_{cat}): η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του συμπλόκου ES προς P

Η μέγιστη ταχύτητα δράσης ορίζεται από τη σχέση:

$$v_{max} = k_2[E_T]$$

όπου $[E_T]$: η ολική συγκέντρωση του ενζύμου

Το διάγραμμα Michaelis – Menten αποτελεί τη γραφική αναπαράσταση της ταχύτητας της ενζυμικής δράσης ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

Οι κινητικές σταθερές των ενζύμων προσδιορίστηκαν για δύο διαφορετικά υποστρώματα, το ABTS και την κατεχόλη. Η κινητική της λακκάσης *AbiLac1* εξετάσθηκε στο εύρος συγκεντρώσεων 5-500 μM για το ABTS και 10-10000 μM για την κατεχόλη, ενώ της λακκάσης *AbiLac2* στο εύρος 5-5000 και 10-7500 μM .

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH για κάθε ένζυμο. Συγκεκριμένα, σε ρυθμιστικό διάλυμα με το βέλτιστο pH για την κάθε λακκάση, όγκου 400 μL , προστέθηκαν 50 μL ενζυμικού διαλύματος κατάλληλης αραίωσης και 50 μL υδατικού διαλύματος ABTS ή κατεχόλης, της επιθυμητής τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν τα 500 μL και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία, βέλτιστη για τη δράση του κάθε ενζύμου. Η διάρκεια της αντίδρασης ήταν 10 min, μετά το πέρας των οποίων, 250 μL από κάθε όγκο αντίδρασης οδηγήθηκαν προς φωτομέτρηση. Η μεταβολή της απορρόφησης ακτινοβολίας μετρήθηκε στα 420nm για το ABTS και στα 450 nm για την κατεχόλη, με τη βοήθεια της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Ως μηδενική απορρόφηση θεωρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (blank), το οποίο

είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά αντί για ένζυμο είχε προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα ίσου όγκου. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις.

Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν οι τιμές ενεργότητας και προσαρμόστηκαν στο μοντέλο Michaelis-Menten με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, με τη βοήθεια του λογισμικού GraphPad Prism 5. Από την προσαρμογή στο πρόγραμμα προσδιορίστηκαν οι τιμές των κινητικών παραμέτρων Michaelis – Menten, K_M και V_{max} .

2.2.7.5 Μελέτη θερμοκρασιακής σταθερότητας

Για τη μελέτη της θερμοκρασιακής σταθερότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε επώαση του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70°C. Η επώαση πραγματοποιήθηκε εντός θερμοστατούμενων επωαστήρων και υδατόλουτρων. Στους χρόνους επώασης 0, 1, 2, 4, 8 και 24 h πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από κάθε θερμοκρασία και μετρήθηκε άμεσα η ενζυμική ενεργότητα των ενζύμων, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.2.2.4, με χρήση του υποστρώματος ABTS και επώαση σε σταθερή θερμοκρασία 35°C εντός της συσκευής φωτομέτρησης microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices). Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τιμή pH βέλτιστη για τη δράση του κάθε ενζύμου.

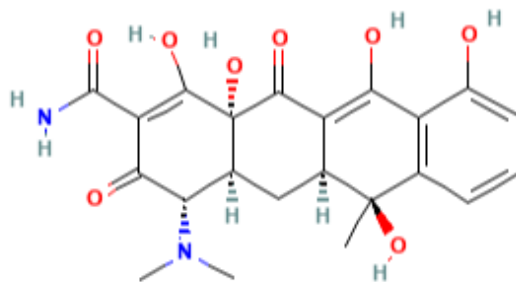
2.2.8 Χρήση των καθαρών ενζύμων, *AbiLac1* και *AbiLac2*, σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές

Σε επόμενο βήμα εξετάστηκε η αξιοποίηση των δύο λακκασών σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές βιοεξυγίανσης. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η ικανότητα των λακκασών αυτών να διασπούν το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, καθώς και ενώσεις της οικογένειας των χλωροφαινολών, με στόχο τη μείωση της τοξικότητάς τους και, επομένως, του αρνητικού τους αντίκτυπου στο περιβάλλον.

2.2.8.1 Εφαρμογή των ενζύμων *AbiLac1* και *AbiLac2* για τη βιομετατροπή της τετρακυκλίνης

Στην συγκεκριμένη εφαρμογή πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις των ενζύμων που απομονώθηκαν με στόχο τη βιομετατροπή της τετρακυκλίνης.

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό στην ιατρική, τόσο στη θεραπεία του ανθρώπου όσο και στην κτηνιατρική, ενώ λόγω της επίμονης παραμονής τους στο περιβάλλον χαρακτηρίζονται ως σημαντικοί μολυσματικοί παράγοντες. Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αντιβιοτικά, ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην τετρακυκλίνη, καθώς η ευρεία παρουσία της σε λύματα και φυσικά υδατικά συστήματα συνδέεται με σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένων οικολογικών κινδύνων και βλαβών για την ανθρώπινη υγεία. Οι περισσότερες, όμως, εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων δεν είναι ικανές να απομακρύνουν αποτελεσματικά τα αντιβιοτικά τετρακυκλίνης, επομένως, υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης εναλλακτικών διεργασιών για την απομάκρυνσή τους από το νερό⁹⁴.



Εικόνα 24. Χημική δομή τετρακυκλίνης

2.2.8.1.1 Προετοιμασία αντιδράσεων και επώαση

Για την προετοιμασία των αντιδράσεων, σε ρυθμιστικό διάλυμα, με τη βέλτιστη τιμή pH για το κάθε ένζυμο, όγκου 800 µL προστέθηκαν 100 µL ενζυμικού διαλύματος (τελική συγκέντρωση 0,056 mg/mL *AbiLac1* και 0,042 mg/mL *AbiLac2* ή σε 0,40 και 0,085 Units/mL μετρημένα με υπόστρωμα κατεχόλης, αντίστοιχα) και 100 µL διαλύματος τετρακυκλίνης, τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 100 mg/L. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν το 1 mL και οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 35°C, υπό ανάδευση 200 rpm. Η επώαση διήρκησε 24 h. Στη συνέχεια, τα αντιδρώντα συστήματα φυλάχθηκαν στην κατάψυξη. Για κάθε ένζυμο πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις, ενώ η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και για το τυφλό διάλυμα (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά αντί για ένζυμο είχε προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα ίσου όγκου.

2.2.8.1.2 Ανάλυση με HPLC

Ο προσδιορισμός της μείωσης της συγκέντρωσης της τετρακυκλίνης στους αντιδρώντες όγκους πραγματοποιήθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

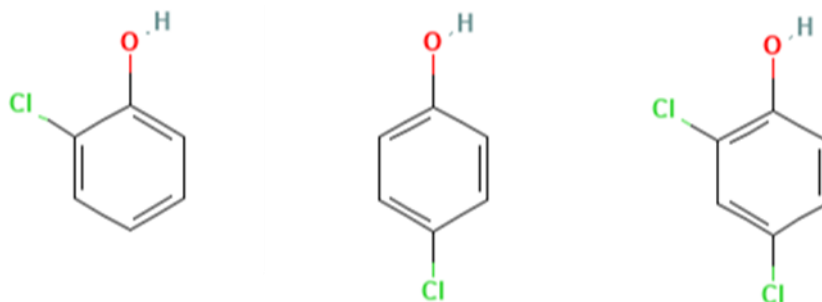
Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πραγματοποιήθηκε με το σύστημα 1260 Infinity II (Agilent Technologies), με χρήση της στήλης C18 CC 250/4.6 Nucleosil 100-5 (Macherey-Nagel), και με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού UV-Vis ProStar 335 Diode Array Detector (Agilent Technologies), με μέτρηση στα 260 nm. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες, A: δισόξινο φωσφορικό κάλιο 25 mM pH=3, και B: ακετονιτρίλιο, εφαρμόζοντας διαβάθμιση 10% B έως 50% B εντός 15 min, με ροή 1 mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 35°C, ενώ ο όγκος της ένεσης ορίστηκε 15 µL. Κάθε ανάλυση διήρκησε 32 min.

Για την ποσοτικοποίηση της τετρακυκλίνης που δεν οξειδώθηκε πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων τετρακυκλίνης 50 και 100 mg/L.

2.2.8.2 Εφαρμογή των ενζύμων *AbiLac1* και *AbiLac2* για τη βιομετατροπή των χλωροφαινόλων

Στην συγκεκριμένη εφαρμογή πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις των ενζύμων που απομονώθηκαν με στόχο τη βιομετατροπή της 2-χλωροφαινόλης, της 4-χλωροφαινόλης και της 2,4-διχλωροφαινόλης.

Οι χλωροφαινόλες είναι χλωριωμένες αρωματικές ενώσεις, οι οποίες λόγω της υψηλής τοξικότητας και της χαμηλής αποικοδομησιμότητάς τους αποτελούν επίμονους οργανικούς ρύπους. Πολλές φυσικές, χημικές και βιολογικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση των χλωροφαινόλων από τα βιομηχανικά λύματα, ωστόσο καμία δεν έχει πετύχει την πλήρη αποικοδόμησή τους⁹⁵.



Εικόνα 25. Χημική δομή της 2-χλωροφαινόλης, της 4-χλωροφαινόλης και της 2,4-διχλωροφαινόλης, αντίστοιχα

2.2.8.2.1 Προετοιμασία αντιδράσεων και επώαση

Αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν για τρεις χλωροφαινόλες: τη 2-χλωροφαινόλη, την 4-χλωροφαινόλη και τη 2,4-διχλωροφαινόλη, ενώ για κάθε μία πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστές αντιδράσεις με το κάθε ένζυμο. Για την προετοιμασία των αντιδράσεων, σε ρυθμιστικό διάλυμα, με τη βέλτιστη τιμή pH για το κάθε ένζυμο, προστέθηκαν 0,09 mg ενζύμου (ποσότητα που αντιστοιχεί, στον όγκο της αντίδρασης, σε 0,64 Units/mL για την *AbiLac1* και 0,17 Units/mL για την *AbiLac2*, μετρημένα με υπόστρωμα την κατεχόλη) και 100 μ L διαλύματος χλωροφαινόλης, τελικής συγκέντρωσης στον αντιδρών όγκο 5 mM. Τελικός όγκος του αντιδρώντος συστήματος ήταν το 1 mL και οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 35°C, υπό ανάδευση 200 rpm. Η επώαση διήρκησε 24 h. Στη συνέχεια, σε κάθε αντιδρών όγκο προστέθηκαν 100 μ L διαλύματος HCl 1 N και ακολούθησε φυγοκέντρηση προς απομάκρυνση των πολυμερών που μπορεί να έχουν συντεθεί. Για κάθε ένζυμο πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις, ενώ η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και για το τυφλό διάλυμα (blank), το οποίο είχε σύσταση ίδια με εκείνη της αντίδρασης αλλά αντί για ένζυμο είχε προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα ίσου όγκου.

2.2.8.2.2 Ανάλυση με HPLC

Ο προσδιορισμός της μείωσης της συγκέντρωσης των χλωροφαινόλων στους αντιδρώντες όγκους πραγματοποιήθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πραγματοποιήθηκε με το σύστημα LC-20AD (Shimadzu), με χρήση της στήλης C18 CC 250/4.6 Nucleosil 100-5 (Macherey-Nagel), και με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού UV-Vis ProStar 335 Diode Array Detector (Agilent Technologies), με μέτρηση στα 285 nm. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ισοκρατικό διάλυμα φωσφορικού οξέος 0,1% v/v και μεθανόλης σε αναλογία 50:50, με ροή 0,8 mL/min. Η στήλη βρισκόταν σε θερμοκρασία δωματίου ενώ ο όγκος της ένεσης ορίστηκε 20 µL. Κάθε ανάλυση διήρκησε 30 min.

Για την ποσοτικοποίηση των χλωροφαινόλων που δεν οξειδώθηκαν πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων 2-χλωροφαινόλης 2,5 και 5 mM, 4-χλωροφαινόλης 2,5 και 5 mM και 2,4-δихλωροφαινόλης 2,5 και 5 mM. Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων, σε 1 mL πρότυπου διαλύματος χλωροφαινόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα Κιτρικού-Φωσφορικών pH 5,5 προστέθηκαν 100 µL διαλύματος HCl 1 N.

2.2.9 Πρωτεομική και βιοπληροφορική ανάλυση

2.2.9.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την προετοιμασία των εξωκυτταρικών διαλυμάτων υγρών καλλιεργειών του *P. citrinopileatus* και του *A. biennis* σε ξυλόζη και σε στελέχη αραβοσίτου, με σκοπό τη μελέτη του συνόλου των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών που έχουν εκκριθεί, πραγματοποιήθηκε, αρχικά, παραλαβή του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας. Για το *A. biennis* εξετάστηκε το εξωκυτταρικό εκχύλισμα των καλλιεργειών, ενώ για το *P. citrinopileatus* μελετήθηκε το διάλυμα απομόνωσης των ενζύμων που είχαν προσκολληθεί στην επιφάνεια της βιομάζας. Στη συνέχεια, τα δείγματα διηθήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν και, ύστερα από ψύξη, οδηγήθηκαν σε συσκευή λυοφιλίωσης προκειμένου να ξηρανθούν μέσω εξάχνωσης. Επισημαίνεται πως για την ξυλόζη πραγματοποιήθηκε διπλή καλλιέργεια, σε ίδιες συνθήκες, για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, ενώ για τα στελέχη αραβοσίτου πραγματοποιήθηκε τριπλή καλλιέργεια, αντίστοιχα.

2.2.9.2 Πρωτεομική Ανάλυση

Τα λυοφιλωμένα δείγματα των υπερκείμενων των καλλιεργειών στάλθηκαν για πρωτεομική ανάλυση στο VIB Proteomics Core (PRC), στο VIB-UGent Center for Medical Biotechnology στο Ghent, Belgium, όπου λήφθηκαν φάσματα μάζας των πεπτιδίων που παράχθηκαν με το όργανο Q Exactive Orbitrap Mass Spectrometer, μέσω της υποδομής EPIC-XS, project number 823839, χρηματοδοτούμενη από το πρόγραμμα Horizon 2020 της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

2.2.9.3 Βιοπληροφορική Ανάλυση

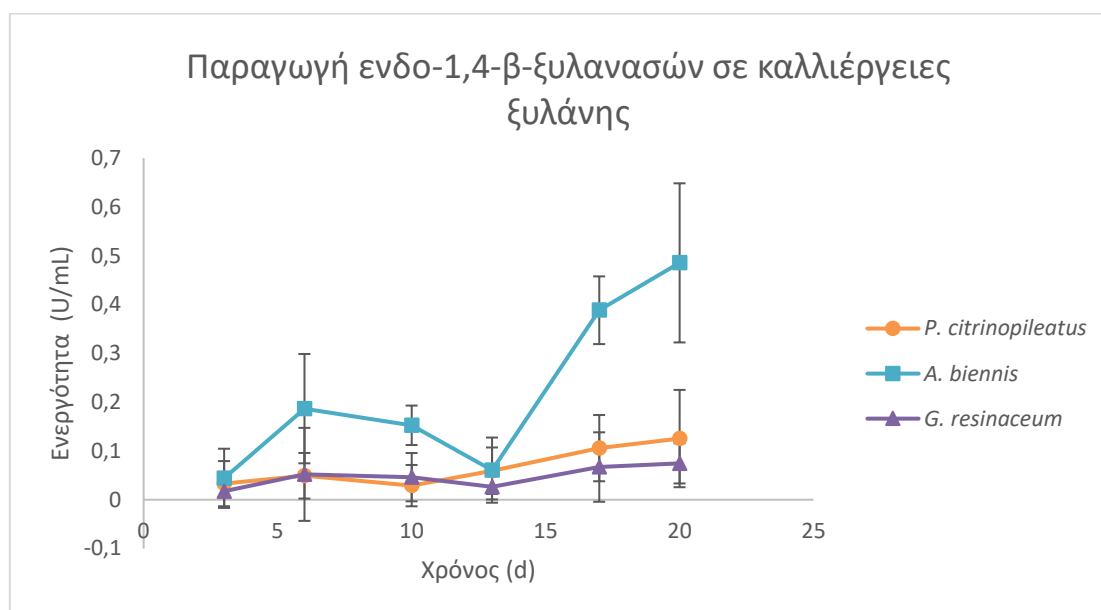
Για τη βιοπληροφορική ανάλυση και επεξεργασία των πρωτεομικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής βιοπληροφορικά εργαλεία: dbCAN2 meta server⁹⁶ (UNL, <https://bcb.unl.edu/dbCAN2/>), NetNGlyc 1.0⁹⁷ (DTU Bioinformatics, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) και NetOGlyc 4.0 Server⁹⁸ (DTU

Bioinformatics, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), SignalP 5.0⁹⁹ (DTU Health Tech, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), ProtParam tool¹⁰⁰ (Expasy, Swiss Institute of Bioinformatics, <https://web.expasy.org/protparam/>), BLAST (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) και SWISS-MODEL¹⁰¹ (Expasy, Swiss Institute of Bioinformatics, <https://swissmodel.expasy.org>).

3 Αποτελέσματα

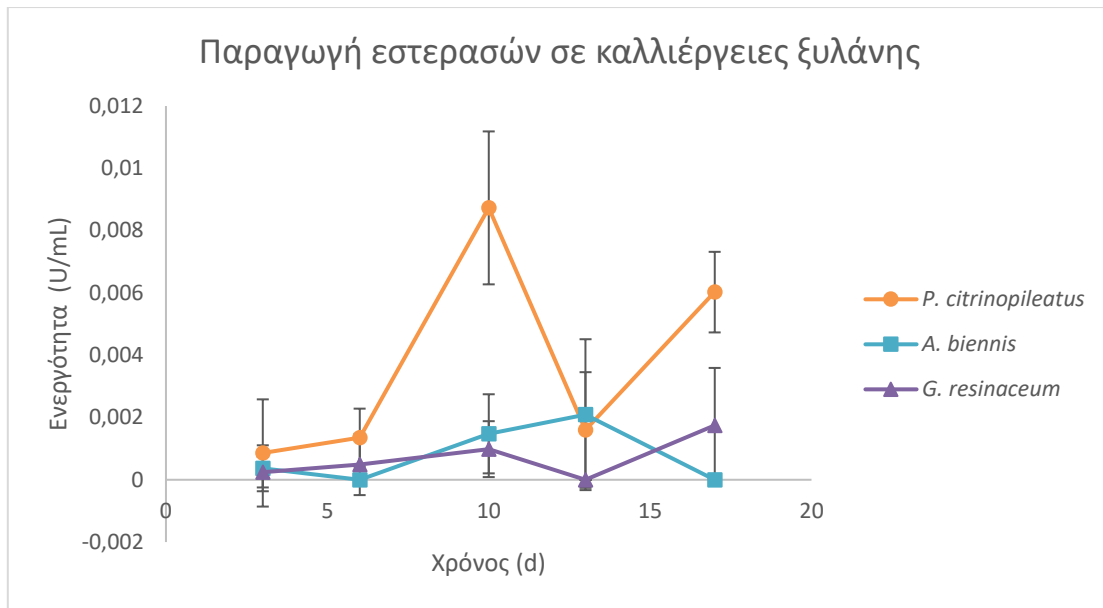
3.1 Ενζυμικό προφίλ σε καλλιέργειες ξυλάνης

Ως αποτέλεσμα της μελέτης των ενζύμων που παράγονται από τα τρία στελέχη Βασιδιομυκήτων κατά την ανάπτυξή τους σε καλλιέργειες ξυλάνης βρώμης, μετρήθηκαν οι ενεργότητες των ενδο-1,4-β-ξυλανασών, των εστερασών και της β-ξυλοζιδάσης. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκαν οι τιμές ενεργότητας σε Units/mL από τη διαφορά της απορρόφησης της αντίδρασης από την απορρόφηση του τυφλού διαλύματος, μέσω των πρότυπων καμπυλών που κατασκευάστηκαν. Οι ενεργότητες των δύο πρώτων ενζύμων απεικονίστηκαν διαγραμματικά ως προς τον χρόνο της δειγματοληψίας από την καλλιέργεια.



Διάγραμμα 1. Η ενεργότητα των ενδο-1,4-β-ξυλανασών ως συνάρτηση του χρόνου ανάπτυξης σε καλλιέργειες ξυλάνης, ανά στέλεχος μήκητα

Από το Διάγραμμα 1 προκύπτει πως για τα στελέχη *P. citrinopileatus* και *G. resinaceum* η παραγωγή των ενδο-1,4-β-ξυλανασών δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη μεταβολή κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, ενώ οι τιμές της ενεργότητας παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα. Αντίθετα, για το στέλεχος *A. biennis* η ενεργότητα παραμένει σχετικά σταθερή έως τη 13^η ημέρα, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί αύξησή της. Καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, η ενεργότητα των ενδοξυλανασών για το συγκεκριμένο στέλεχος λαμβάνει υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με την αντίστοιχη ενεργότητα των άλλων δύο στελεχών.



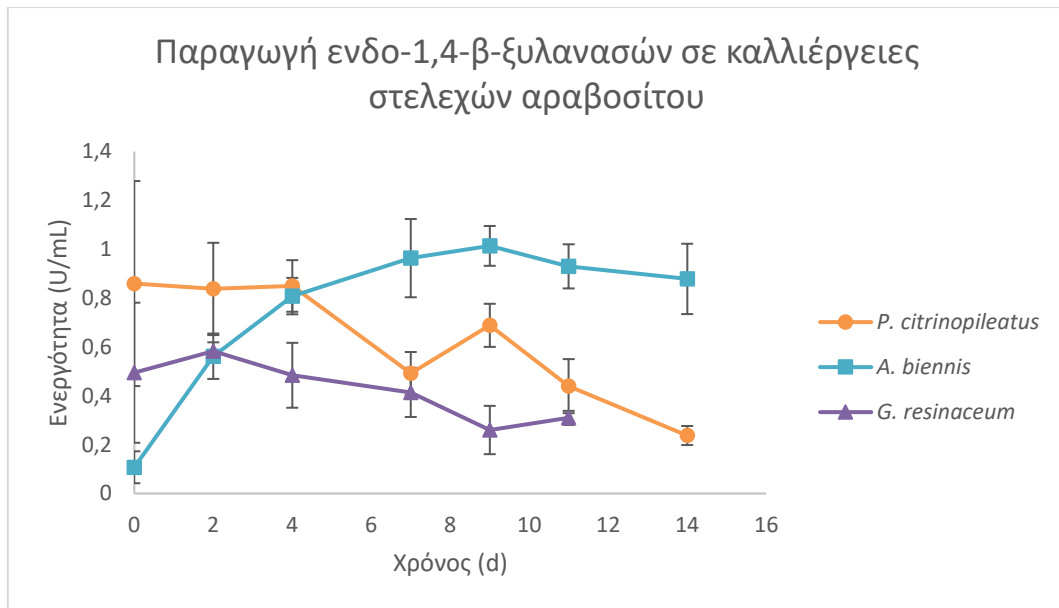
Διάγραμμα 2. . Η ενεργότητα των εστερασών ως συνάρτηση του χρόνου ανάπτυξης σε καλλιέργειες ξυλάνης, ανά στέλεχος μύκητα

Από το Διάγραμμα 2 προκύπτει πως για τα στελέχη *A. biennis* και *G. resinaceum* η παραγωγή των εστερασών δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη μεταβολή κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, ενώ οι τιμές της ενεργότητας παραμένουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Αντίθετα, για το στέλεχος *P. citrinopileatus* εμφανίζεται ένα μέγιστο τη 10^η ημέρα, ενώ οι τιμές της ενεργότητας παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα. Ως εκ τούτου, κανένα από τα τρία εξεταζόμενα στελέχη δεν μπορεί να θεωρηθεί καλός παραγωγός εστερασών κατά την ανάπτυξή του σε καλλιέργεια ξυλάνης.

Ως προς τη β-ξυλοζιδάση, η ενεργότητά της δεν ανιχνεύθηκε για κανένα στέλεχος, καθ'όλη τη διάρκεια των καλλιεργειών.

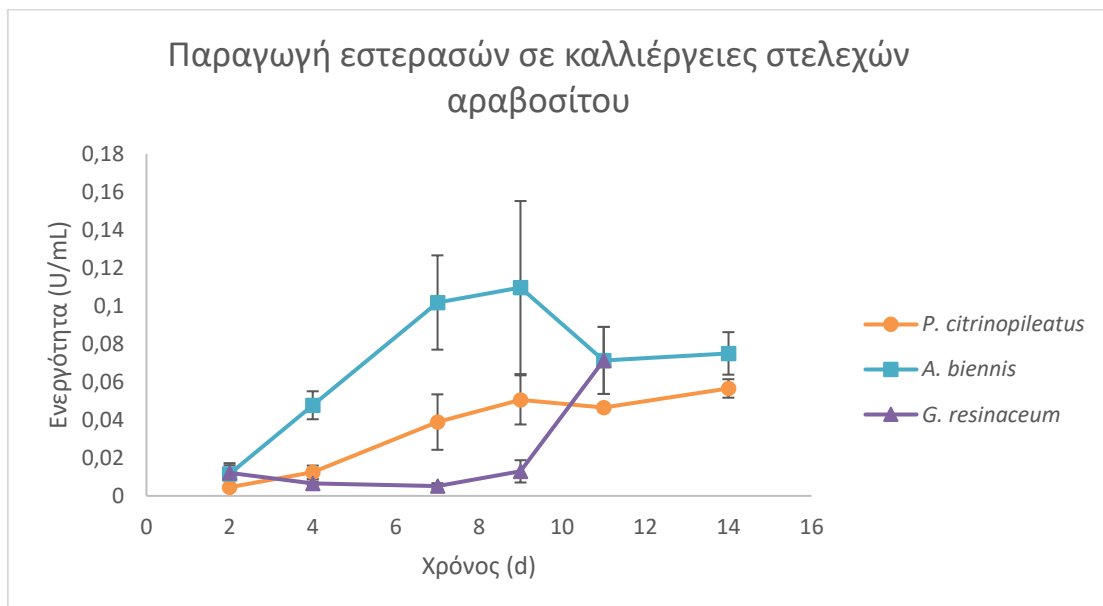
3.2 Ενζυμικό προφίλ σε καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου

Ως αποτέλεσμα της μελέτης των ενζύμων που παράγονται από τα τρία στελέχη Βασιδιομυκήτων κατά την ανάπτυξή τους σε καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου, μετρήθηκαν οι ενεργότητες των ενδο-1,4-β-ξυλανασών, των εστερασών και των λακκασών. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκαν οι τιμές ενεργότητας σε Units/mL από τη διαφορά της απορρόφησης της αντίδρασης από την απορρόφηση του τυφλού διαλύματος, μέσω των πρότυπων καμπυλών που κατασκευάστηκαν. Οι ενεργότητες των τριών αυτών ενζύμων απεικονίστηκαν διαγραμματικά ως προς τον χρόνο της δειγματοληψίας από την καλλιέργεια.



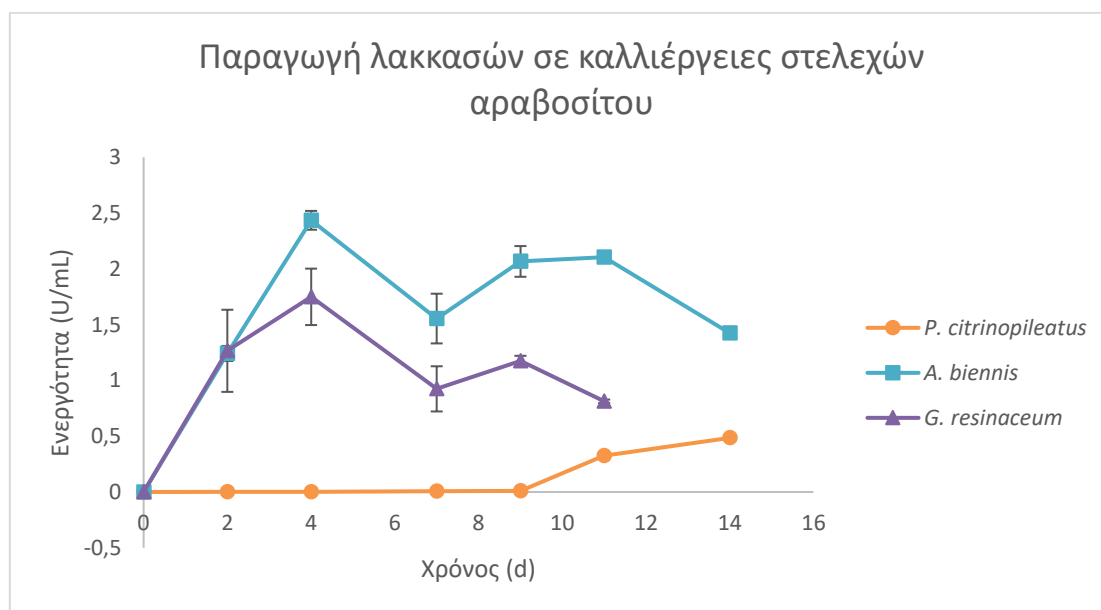
Διάγραμμα 3. Η ενεργότητα των ενδο-1,4-β-ξυλανασών ως συνάρτηση του χρόνου ανάπτυξης σε καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου, ανά στέλεχος μύκητα

Από το Διάγραμμα 3 προκύπτει πως για τα στελέχη *P. citrinopileatus* και *G. resinaceum* η παραγωγή των ενδοξυλανασών παρουσιάζει σταθερή πορεία κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Αντίθετα, για το στέλεχος *A. biennis* παρατηρείται συνεχόμενη αύξηση της παραγωγής ενδοξυλανασών έως και την 9^η ημέρα καλλιέργειας, μετά την οποία η ενεργότητα φθίνει, παραμένοντας, ωστόσο, σε υψηλά επίπεδα. Η μη μηδενική τιμή της ενεργότητας κατά τη δειγματοληψία την ημέρα 0 οφείλεται στη μεταφορά ήδη παραγόμενων ενδοξυλανασών από την προκαλλιέργεια των στελεχών σε υπόστρωμα ξυλόζης κατά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών.



Διάγραμμα 4. Η ενεργότητα των εστερασών ως συνάρτηση του χρόνου ανάπτυξης σε καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου, ανά στέλεχος μύκητα

Από το Διάγραμμα 4 προκύπτει πως για τα στελέχη *P. citrinopileatus* και *A. biennis* η παραγωγή των εστερασών παρουσιάζει ανοδική πορεία έως και την 9^η ημέρα της καλλιέργειας, μετά την οποία οι εστεράσες του *A. biennis* εμφανίζουν μικρή πτώση, ενώ του *P. citrinopileatus* συνεχίζουν να αυξάνονται. Αντίθετα, για το στέλεχος *G. resinaceum* παρατηρείται ιδιαίτερα χαμηλή ενεργότητα εστερασών έως και την 9^η ημέρα καλλιέργειας, μετά την οποία η ενεργότητα αυξάνεται. Ωστόσο, η ενεργότητα των εστερασών λαμβάνει χαμηλές τιμές και για τα τρία στελέχη καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας.



Διάγραμμα 5. Η ενεργότητα των λακκασών (Units/mL) ως συνάρτηση του χρόνου ανάπτυξης σε καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου, ανά στέλεχος μύκητα

Από το Διάγραμμα 5 προκύπτει πως για τα στελέχη *A. biennis* και *G. resinaceum* η παραγωγή των λακκασών παρουσιάζει αρχικά ανοδική πορεία και, στη συνέχεια, μειώνεται και αυξάνεται ξανά. Η ύπαρξη δύο μεγίστων αποτελεί χαρακτηριστική μορφή της παραγωγής των λακκασών καθώς το κάθε στέλεχος εκκρίνει περισσότερες από μία λακκάσες, οι οποίες παράγονται διαφορετικές χρονικές στιγμές. Αντίθετα, για το στέλεχος *P. citrinopileatus* παρατηρείται μηδενική σχεδόν παραγωγή λακκασών έως και την 9^η ημέρα της καλλιέργειας, μετά την οποία η ενεργότητά τους αυξάνεται, λαμβάνοντας, ωστόσο, χαμηλότερες τιμές από τις αντίστοιχες των άλλων δύο στελεχών.

3.2.1 Λοιπές ενζυμικές ενεργότητες

Ως αποτέλεσμα της μελέτης των ενζύμων που παράγονται από τα τρία στελέχη Βασιδιομυκήτων την τελευταία ημέρα της ανάπτυξής τους σε καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου, μετρήθηκαν οι ενεργότητες ορισμένων υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, για τις γλυκουρονικές εστεράσες, την ευέλικτη υπεροξειδάση, τις κυτταρινάσες, τις οξειδάσες των αρυλ-αλκοολών και τις οξειδάσες της γαλακτόζης, οι τιμές ενεργότητας υπολογίστηκαν σε Units/mL από τη διαφορά της απορρόφησης της αντίδρασης από την απορρόφηση του τυφλού διαλύματος,

μέσω των πρότυπων καμπυλών που κατασκευάστηκαν ή του νόμου των Lambert-Beer, ανάλογα με το ένζυμο. Για τα ένζυμα αραβινοφουρανοζιδάσες, εστεράσες του οξικού οξέος και εστεράσες του φερουλικού οξέος οι τιμές ενεργότητας υπολογίστηκαν σε Units/mL από τη διαφορά του εμβαδού κορυφής του αντίστοιχου χρωματογραφήματος από το εμβαδόν κορυφής του τυφλού διαλύματος, μέσω του εμβαδού κορυφής των πρότυπων διαλυμάτων.

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι υπολογιζόμενες ενεργότητες σε Units/L για τα ένζυμα που μελετήθηκαν. Σημειώνεται πως το *P. citrinopileatus* (extracted) αναφέρεται στο διάλυμα απομόνωσης των ενζύμων του *P. citrinopileatus*.

Πίνακας 7. Υπολογιζόμενες ενεργότητες ενζύμων που παράγονται από τα τρία στελέχη Βασιδιομυκήτων κατά την τελευταία ημέρα καλλιέργειάς τους σε στέλεχη αραβοσίτου, εκφρασμένες σε Units/L

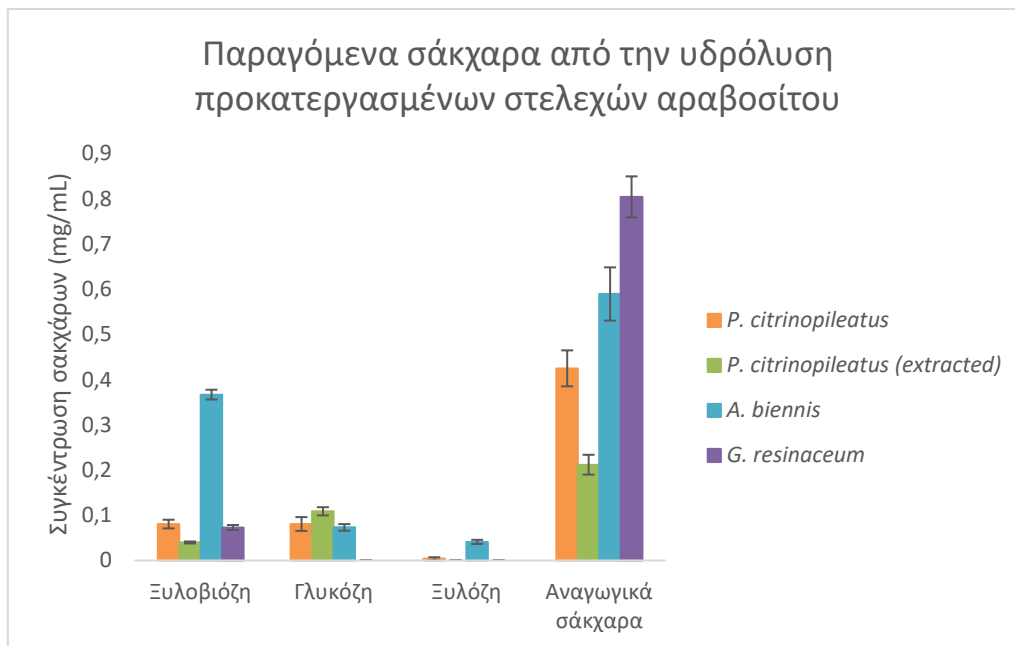
Ένζυμο	<i>P. citrinopileatus</i> (Units/L)	<i>P. citrinopileatus</i> (extracted) (Units/L)	<i>A. biennis</i> (Units/L)	<i>G. resinaceum</i> (Units/L)
Αραβινοφουρανοζιδάσες	0,230 ± 0,003	0,028 ± 0,002	-	-
Γλυκουρονικές εστεράσες	6,1 ± 0,3	9 ± 1	-	-
Ενδο-1,4-β-ξυλανάσες	238 ± 39	28 ± 2	879 ± 144	310 ± 29
Εστεράσες	57 ± 5	15 ± 2	75 ± 11	71 ± 18
Εστεράσες του οξικού οξέος	18,7 ± 0,8	1,8 ± 0,4	8,8 ± 0,4	10 ± 1
Εστεράσες του φερουλικού οξέος	-	-	-	-
Ευέλκτες υπεροξειδάσες	-	-	-	-
Κυτταρινάσες	148 ± 39	11 ± 1	212 ± 43	262 ± 43
Λακκάσες	485 ± 6	89 ± 3	1424 ± 3	813 ± 16
Οξειδάσες των αρυλ-αλκοολών	-	-	3,5 ± 0,5	6,2 ± 2
Οξειδάσες της γαλακτόζης	-	-	-	-

Από τον Πίνακα 7 προκύπτει πως κανένα από τα τρία στελέχη δεν παράγει ανιχνεύσιμες ενεργότητες εστερασών του φερουλικού οξέος, ευέλκτων υπεροξειδασών και οξειδασών της γαλακτόζης. Όσον αφορά το *P. citrinopileatus*, η ενεργότητα των ενζύμων που παράγονται είναι μεγαλύτερη στο εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας σε σύγκριση με το διάλυμα απομόνωσης των ενζύμων. Μεγαλύτερη τιμή λαμβάνει η ενεργότητα των λακκασών, ακολουθούμενη από εκείνη των ενδοξυλανασών και των κυτταρινασών. Ως προς τα άλλα δύο στελέχη, παρατηρείται παραγωγή λιγότερων ενζύμων, με μεγαλύτερες ή παρόμοιες ενεργότητες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες του *P. citrinopileatus*. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *A. biennis* εμφανίζει μεγάλη ενεργότητα λακκασών ακολουθούμενη από εκείνη των ενδοξυλανασών και των κυτταρινασών, ενώ αντίστοιχη εικόνα εμφανίζει και το στέλεχος *G. resinaceum*. Ως προς τις τρεις αυτές επικρατέστερες οικογένειες ενζύμων, μεγαλύτερη ενεργότητα λακκασών και ενδοξυλανασών εμφανίζει το στέλεχος *A. biennis*, ενώ κυτταρινασών το στέλεχος *G. resinaceum*. Και τα τρία στελέχη εμφανίζουν ένα ισχυρό οξειδωτικό σύστημα, ενώ παράγουν, επίσης, ένα ευρύ φάσμα υδρολυτικών ενζύμων, κύριων και βοηθητικών, σε χαμηλότερες, ωστόσο, ποσότητες.

3.2.2 Υδρόλυση υποστρωμάτων με ενζυμικά συμπυκνώματα

Ως αποτέλεσμα της μελέτης υδρόλυσης των προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου και του προκατεργασμένου ξύλου οξιάς (Ενότητα 2.2.4.1) με χρήση των ακατέργαστων ενζυμικών εκχυλισμάτων από τις καλλιέργειες των τριών στελεχών σε στελέχη αραβοσίτου ελήφθησαν οι συγκεντρώσεις των σακχάρων που απελευθερώθηκαν. Συγκεκριμένα, από τα εμβάδα των κορυφών των αντίστοιχων χρωματογραφημάτων υπολογίστηκαν οι τιμές συγκέντρωσης των παραγόμενων σακχάρων στον όγκο της αντίδρασης, σε mg/mL, μέσω του εμβαδού κορυφής των πρότυπων διαλυμάτων σακχάρων. Επιπλέον, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των συνολικών αναγωγικών σακχάρων μέσω της απορρόφησης με τη μέθοδο δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Σημειώνεται πως η αρχική συγκέντρωση των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων στον όγκο της αντίδρασης ήταν 50 mg/mL.

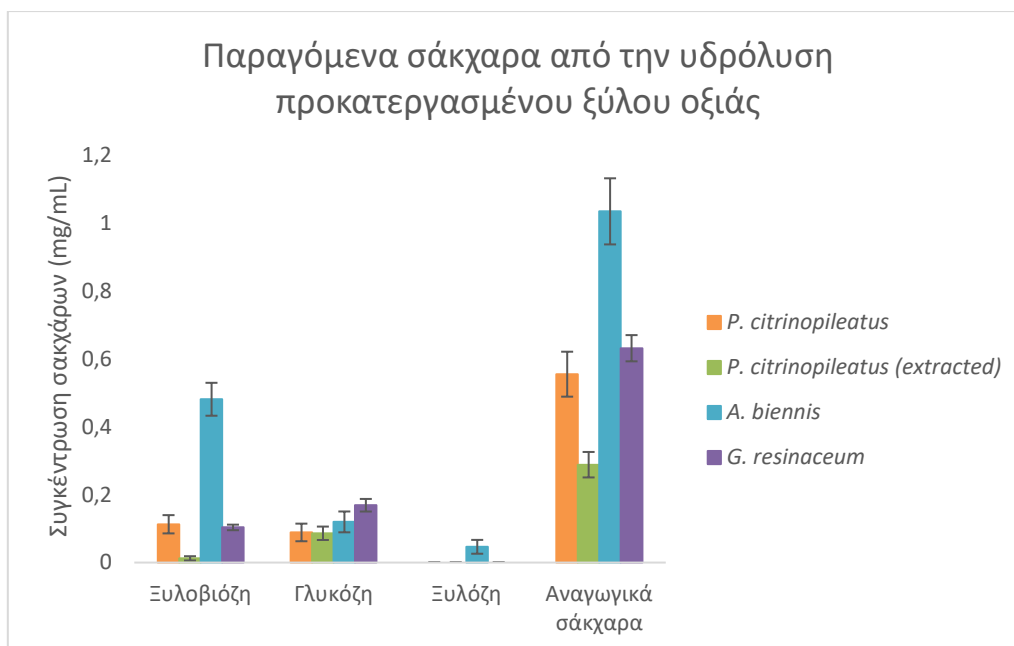
Στα Διαγράμματα 6 και 7 παρουσιάζονται οι υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις σε mg/mL των παραγόμενων σακχάρων της υδρόλυσης. Σημειώνεται πως το *P. citrinopileatus* (extracted) αναφέρεται στο διάλυμα απομόνωσης των ενζύμων του *P. citrinopileatus*.



Διάγραμμα 6. Η συγκέντρωση των παραγόμενων σακχάρων από την υδρόλυση προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου με τη χρήση των ακατέργαστων ενζυμικών εκχυλισμάτων των καλλιεργειών Βασιδιομυκήτων

Από το Διάγραμμα 6 προκύπτει μεγαλύτερη απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων κατά την υδρόλυση με το εξωκυτταρικό ενζυμικό εκχύλισμα του στελέχους *G. resinaceum* φτάνοντας ολική συγκέντρωση 0,80 mg/mL, ενώ ακολουθεί το εκχύλισμα του στελέχους *A. biennis* με συγκέντρωση 0,59 mg/mL. Τα εκχυλίσματα και των τριών στελεχών, συμπεριλαμβανομένου του διαλύματος απομόνωσης των ενζύμων του *P. citrinopileatus*, οδηγούν σε απελευθέρωση ξυλοβιόζης, με μεγαλύτερη παραγωγή να προκύπτει από την υδρόλυση με το εκχύλισμα του *A. biennis*, σε συγκέντρωση 0,37 mg/mL. Γλυκόζη φαίνεται να απελευθερώνεται μόνο κατά την υδρόλυση με τα

εκχυλίσματα του *P. citrinopileatus* και του *A. biennis*, με ελαφρώς μεγαλύτερη τη συγκέντρωση γλυκόζης κατά την υδρόλυση με το διάλυμα απομόνωσης ενζύμων του *P. citrinopileatus*, ενώ ξυλόζη παρατηρείται κυρίως κατά τη δράση των ενζύμων του *A. biennis*.



Διάγραμμα 7. Η συγκέντρωση των παραγόμενων σακχάρων από την υδρόλυση προκατεργασμένου ξύλου οξιάς με τη χρήση των ακατέργαστων ενζυμικών εκχυλισμάτων των καλλιεργειών Βασιδιομυκήτων

Από το Διάγραμμα 7 προκύπτει μεγαλύτερη απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων κατά την υδρόλυση με το εξωκυτταρικό ενζυμικό εκχύλισμα του στελέχους *A. biennis* φτάνοντας ολική συγκέντρωση 1,04 mg/mL, ενώ ακολουθεί το εκχύλισμα του στελέχους *G. resinaceum* με συγκέντρωση 0,63 mg/mL. Τα εκχυλίσματα και των τριών στελεχών, συμπεριλαμβανομένου του διαλύματος απομόνωσης των ενζύμων του *P. citrinopileatus*, οδηγούν σε απελευθέρωση ξυλοβιόζης, με μεγαλύτερη παραγωγή να προκύπτει από την υδρόλυση με το εκχύλισμα του *A. biennis*, σε συγκέντρωση 0,48 mg/mL. Γλυκόζη φαίνεται, επίσης, να απελευθερώνεται από την υδρόλυση με τα εκχυλίσματα και των τριών στελεχών, με ελαφρώς μεγαλύτερη τη συγκέντρωση γλυκόζης κατά την υδρόλυση με το εκχύλισμα του *G. resinaceum*, ενώ ξυλόζη παρατηρείται μόνο κατά τη δράση των ενζύμων του *A. biennis*.

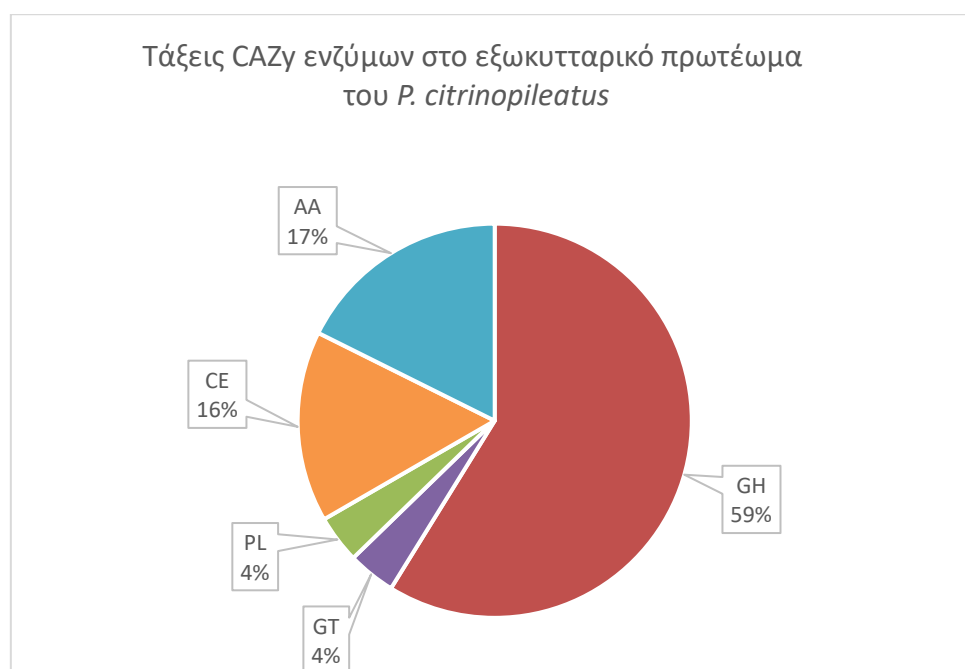
Συγκριτικά για τα δύο λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα, η απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων από την αντίδραση υδρόλυσης είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση υδρόλυσης του προκατεργασμένου ξύλου οξιάς από τα εκχυλίσματα των στελεχών *A. biennis* και *P. citrinopileatus* σε σύγκριση με την υδρόλυση των προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα, ενώ για το εκχύλισμα του *G. resinaceum* και το διάλυμα απομόνωσης των ενζύμων του *P. citrinopileatus* οδηγούν σε παρόμοια απελευθέρωση και για τα δύο υποστρώματα. Όσον αφορά τα μεμονωμένα σάκχαρα, μεγαλύτερη απελευθέρωση και των τριών παρατηρείται κατά την υδρόλυση του προκατεργασμένου ξύλου οξιάς σε σύγκριση

με τα προκατεργασμένα στελέχη αραβοσίτου, από όλα τα ενζυμικά εκχυλίσματα, με εξαίρεση το διάλυμα απομόνωσης ενζύμων του *P. citrinopileatus*, το οποίο οδηγεί σε μεγαλύτερη απελευθέρωση ξυλοβιόζης και γλυκόζης κατά την υδρόλυση των προκατεργασμένων στελεχών αραβοσίτου.

3.3 Πρωτεομική ανάλυση

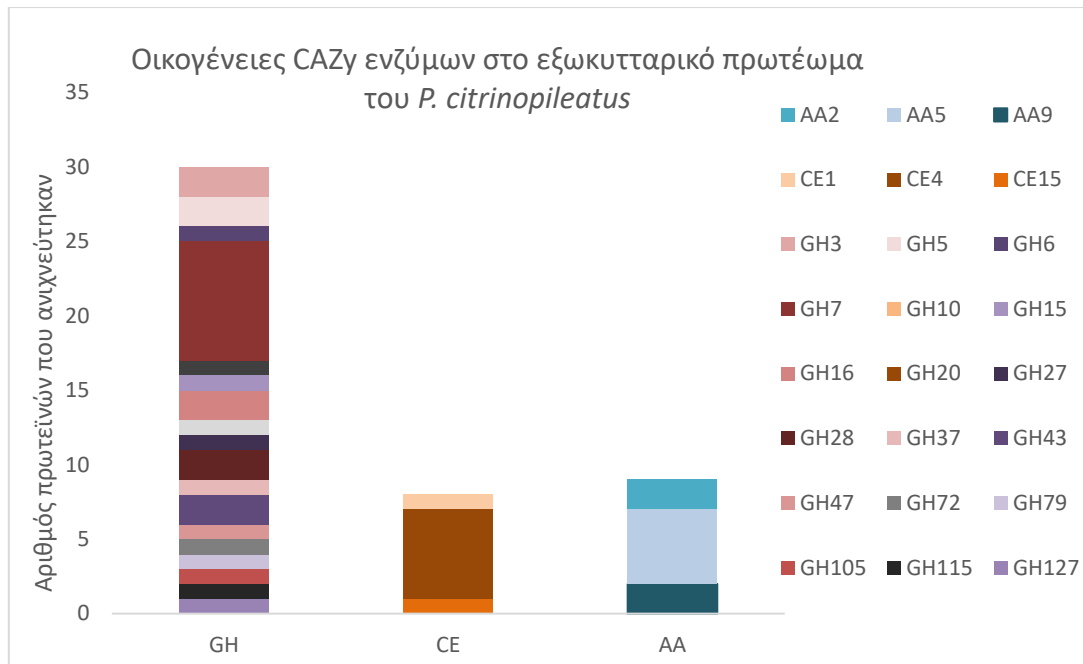
3.3.1 Ανάλυση του εξωκυτταρικού πρωτεώματος του *P. citrinopileatus*

Από τις πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στο εξωκυτταρικό εκχύλισμα των καλλιεργειών ξυλόζης και στο διάλυμα απομόνωσης ενζύμων του *P. citrinopileatus*, με βάση τα πεπτίδια που ανιχνεύτηκαν, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός εκείνων που εκκρίνονται από τον μικροοργανισμό και που ανήκουν στην τράπεζα δεδομένων CAZy, με τη βοήθεια του βιοπληροφορικού εργαλείου dbCAN2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8.



Διάγραμμα 8. Κατανομή των ανιχνευμένων ενζύμων του πρωτεώματος του *P. citrinopileatus* στις κατηγορίες της τράπεζας δεδομένων CAZy

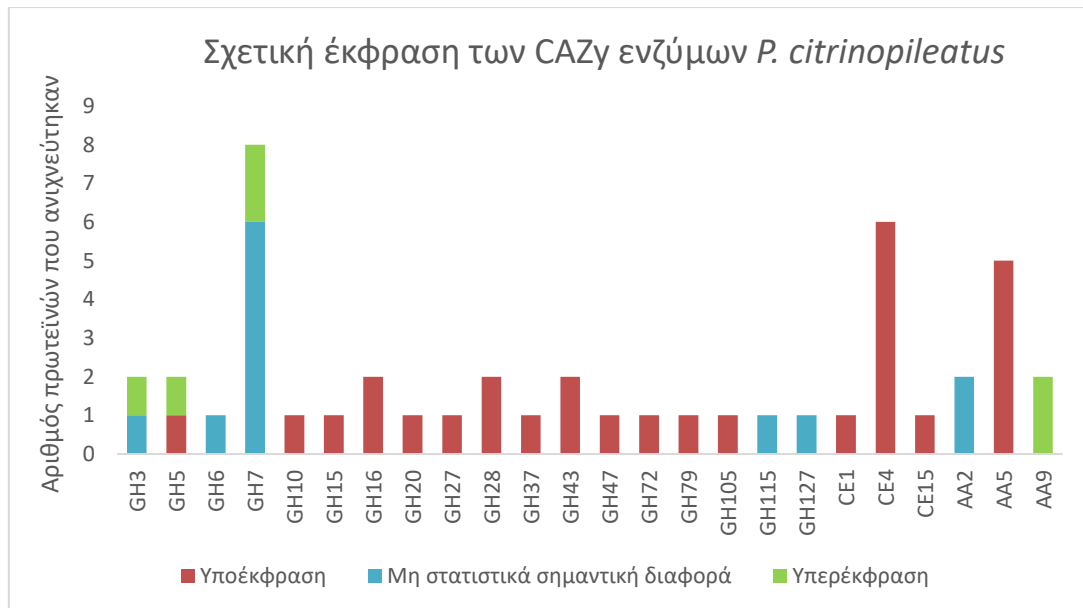
Από τα ένζυμα που ανιχνεύτηκαν, 30 ανήκουν στην τάξη των υδρολασών (Glycoside Hydrolases, GH) αποτελώντας το 59% των συνολικών και 9 στην τάξη των οξειδοαναγωγικών ενζύμων (Auxiliary Activities, AA) αποτελώντας το 17%. Ακολουθούν οι εστεράσες (Carbohydrate Esterases, CE) με 8 ένζυμα, οι λυάσες (Polysaccharide Lyases, PL) με 2 ένζυμα, ενώ 2 ένζυμα ανιχνεύτηκαν και από την τάξη των τρανσφερασών (GlycosylTransferases, GT). Συγκεκριμένα, η κατανομή των ανιχνευμένων ενζύμων στις επιμέρους οικογένειες παρουσιάζεται για τις GH, CE και AA στο Διάγραμμα 9.



Διάγραμμα 9. Κατανομή των ανιχνευμένων υδρολασών, εστερασών και οξειδοαναγωγικών ενζύμων του *P. citrinopileatus* στις επιμέρους οικογένειες CAZy

Όσον αφορά τις υδρολάσες, η οικογένεια στην οποία ανήκουν τα περισσότερα ανιχνευμένα ένζυμα είναι η GH7, η οποία περιλαμβάνει ενδοκυτταρινάσες, αποτελώντας το 27% των εκκρινόμενων GH. Η κυρίαρχη οικογένεια των εστερασών φαίνεται να είναι η CE4, αποτελώντας το 75% των εκκρινόμενων CE. Τέλος, όσον αφορά τα οξειδοαναγωγικά ένζυμα, η οικογένεια στην οποία κατατάσσονται τα περισσότερα ανιχνευμένα ένζυμα είναι η AA5_1, η οποία περιλαμβάνει οξειδάσες του γλυοξυλικού οξέος αποτελώντας συνολικά το 56% των εκκρινόμενων AA.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκριτική μελέτη των εκκρινόμενων ενζύμων ανάμεσα στις καλλιέργειες με υπόστρωμα την ξυλόζη (“δείγμα ελέγχου”) και σε εκείνες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα τα στελέχη αραβοσίτου και συγκεκριμένα στα ένζυμα που βρέθηκαν προσκολλημένα στη βιομάζα. Από τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης και ύστερα από στατιστική επεξεργασία, διαπιστώθηκε η υποέκφραση και η υπερέκφραση ορισμένων ενζύμων, τα οποία παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 10.



Διάγραμμα 10. Σχετική έκφραση των εκκρινόμενων ενζύμων του *P. citrinopileatus* σε καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου σε σύγκριση με καλλιέργειες ξυλόζης

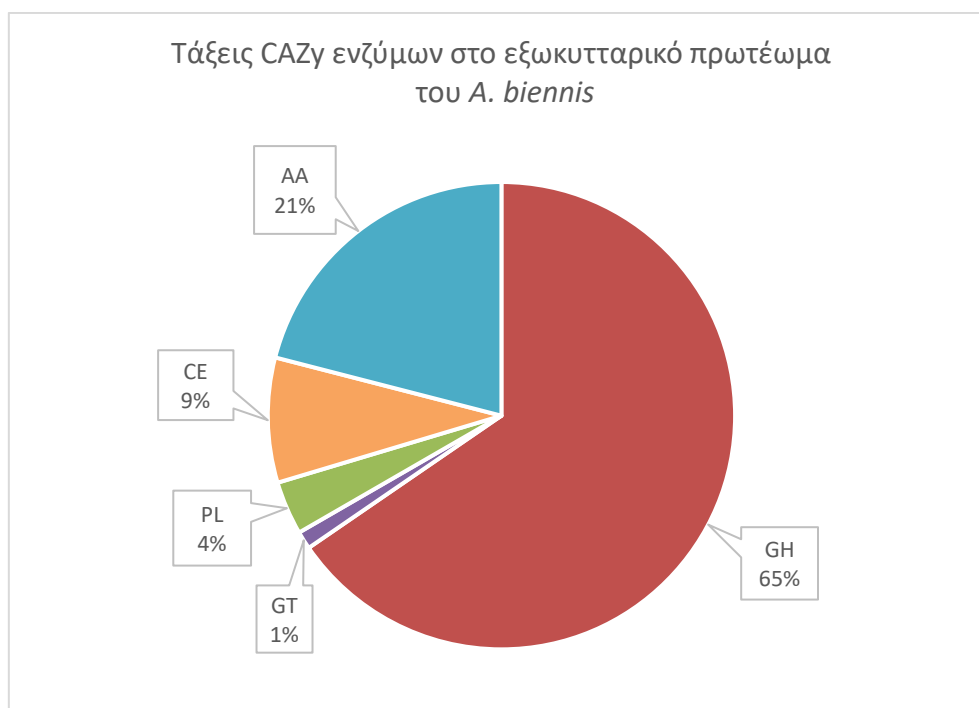
Ός προς το σύνολο των εκκρινόμενων ενζύμων, το 62% εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στις καλλιέργειες ξυλόζης, το 13% υπερεκφράζεται στις καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου, ενώ για το υπόλοιπο 25% δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο υποστρωμάτων. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις υδρολάσες, το μεγαλύτερο ποσοστό εκφράζεται περισσότερο στις καλλιέργειες ξυλόζης, ενώ οι οικογένειες GH10,15,16,20,27,28,43,47,79,105 δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου στο διάλυμα απομόνωσης των ενζύμων στις καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου. Για τις εστεράσες, το 100% υποεκφράζεται στις καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου, ενώ χαρακτηριστικά η οικογένεια CE15 δεν ανιχνεύτηκε ποσοτικά καθόλου σε αυτές. Τέλος, όσον αφορά τα ένζυμα με οξειδοαναγωγική δράση, η οικογένεια AA2, η οποία περιλαμβάνει υπεροξειδάσες, δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο συνθήκες, η AA5 εκφράζεται περισσότερο στις καλλιέργειες ξυλόζης, ενώ η AA9, η οποία περιλαμβάνει μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών, εκφράζεται μόνο στις καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου.

Επισημαίνεται πως τα ένζυμα που ανιχνεύτηκαν στις καλλιέργειες σε στελέχη αραβοσίτου αφορούν εκείνα που απομονώθηκαν από την επιφάνεια επαφής του μικροοργανισμού με τη βιομάζα. Συνεπώς, η μη ανίχνευση ορισμένων ενζύμων ή η υποέκφρασή τους στις καλλιέργειες αυτές δεν συνεπάγεται μη έκκρισή τους από τον μικροοργανισμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι λακκάσες (AA1), οι οποίες ενώ εντοπίστηκαν μέσω της ενεργότητάς τους στο εξωκυτταρικό εκχύλισμα του *P. citrinopileatus*, δεν ανιχνεύτηκαν μέσω πρωτεομικής ανάλυσης στο διάλυμα απομόνωσης του μικροοργανισμού.

3.3.2 Ανάλυση του εξωκυτταρικού πρωτεώματος του *A. biennis*

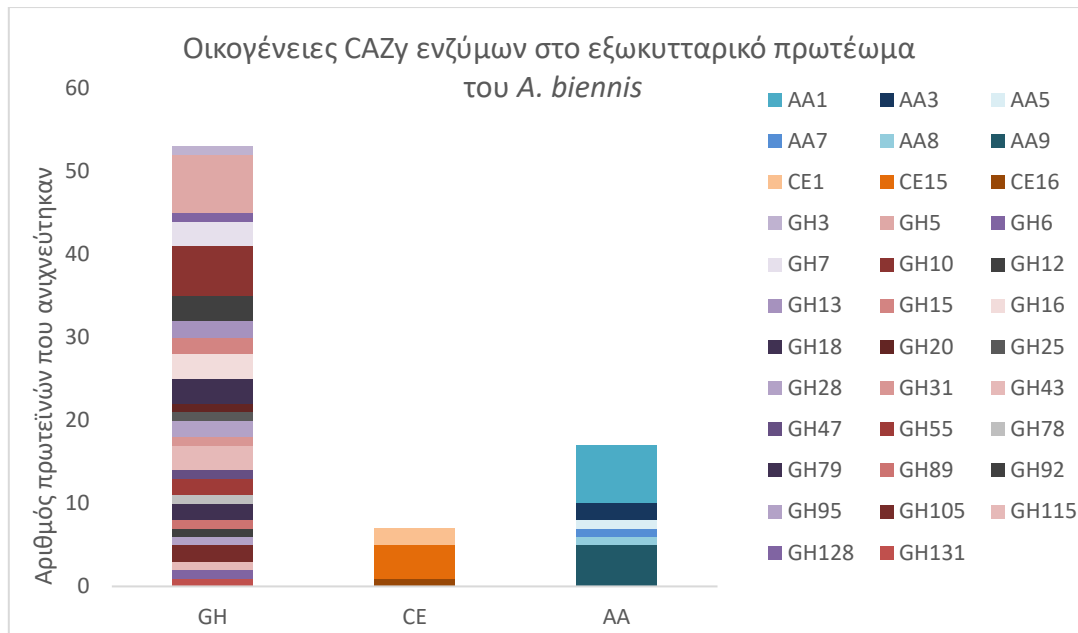
Όσον αφορά το στέλεχος *A. biennis*, από τις πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στο εξωκυτταρικό εκχύλισμα των καλλιεργειών του, με βάση τα πεπτίδια που ανιχνεύτηκαν, πραγματοποιήθηκε, αρχικά, διαχωρισμός εκείνων που εκκρίνονται

από τον μικροοργανισμό και που ανήκουν στην τράπεζα δεδομένων CAZy, με τη βοήθεια του βιοπληροφορικού εργαλείου dbCAN2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 11.



Διάγραμμα 11. Κατανομή των ανιχνευμένων ενζύμων του πρωτεώματος του *A. biennis* στις κατηγορίες της τράπεζας δεδομένων CAZy

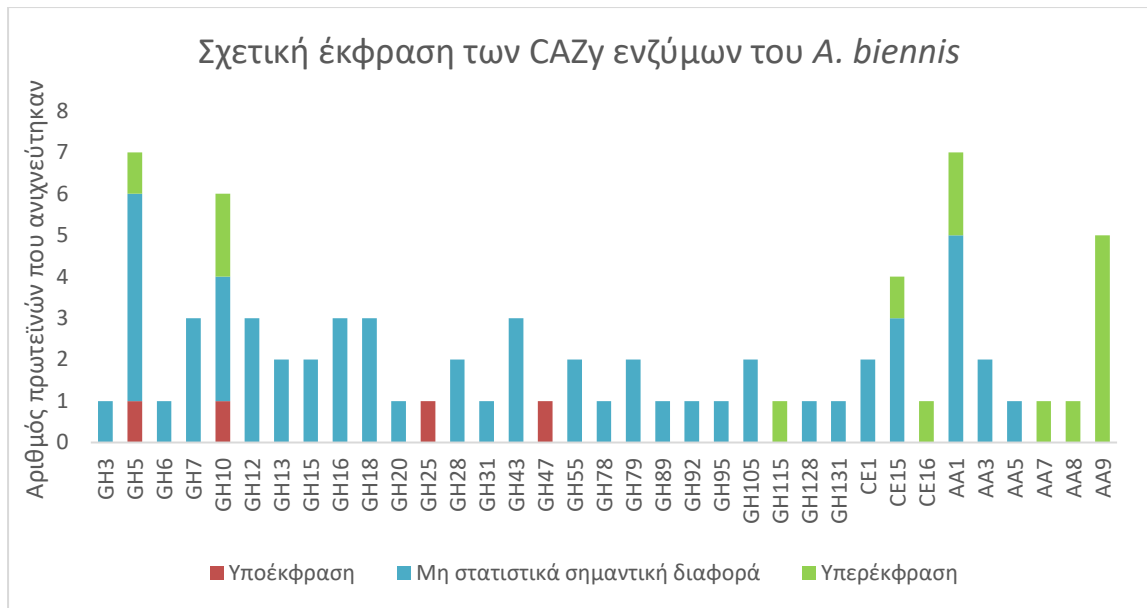
Από τα ένζυμα που ανιχνεύτηκαν, 53 ανήκουν στην τάξη των υδρολασών (Glycoside Hydrolases, GH) αποτελώντας το 65% των συνολικών και 17 στην τάξη των οξειδοαναγωγικών ενζύμων (Auxiliary Activities, AA) αποτελώντας το 21%. Ακολουθούν οι εστεράσες (Carbohydrate Esterases, CE) με 7 ένζυμα, οι λυάσες (Polysaccharide Lyases, PL) με 3 ένζυμα, ενώ 1 ένζυμο ανιχνεύτηκε από την τάξη των τρανσφερασών (GlycosylTransferases, GT). Συγκεκριμένα, η κατανομή των ανιχνευμένων ενζύμων στις επιμέρους οικογένειες παρουσιάζεται για τις GH, CE και AA στο Διάγραμμα 12.



Διάγραμμα 12. Κατανομή των ανιχνευμένων υδρολασών, εστερασών και οξειδοαναγωγικών ενζύμων του *A. biennis* στις επιμέρους οικογένειες CAZy

Όσον αφορά τις υδρολάσες, οι οικογένειες στις οποίες ανήκουν τα περισσότερα ανιχνευμένα ένζυμα είναι η GH5 και η GH10, οι οποίες περιλαμβάνουν κυρίως ξυλανολυτικά ένζυμα, αποτελώντας συνολικά το 25% των εκκρινόμενων GH. Η κυρίαρχη οικογένεια των εστερασών φαίνεται να είναι η CE15, η οποία περιλαμβάνει 4-ο-μεθυλ-γλυκουρονικές μεθυλεστεράσες, αποτελώντας το 57% των εκκρινόμενων CE. Τέλος, όσον αφορά τα οξειδοαναγωγικά ένζυμα, οι οικογένειες στις οποίες κατατάσσονται τα περισσότερα ανιχνευμένα ένζυμα είναι η AA1 και η AA9, οι οποίες περιλαμβάνουν λακκάσες και μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών, αντίστοιχα, αποτελώντας συνολικά το 71% των εκκρινόμενων AA.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκριτική μελέτη των εκκρινόμενων ενζύμων ανάμεσα στις καλλιέργειες με υπόστρωμα την ξυλόζη (“δείγμα ελέγχου”) και σε εκείνες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα τα στελέχη αραβοσίτου. Από τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης και ύστερα από στατιστική επεξεργασία, διαπιστώθηκε η υποέκφραση και η υπερέκφραση ορισμένων ενζύμων, τα οποία παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 13.

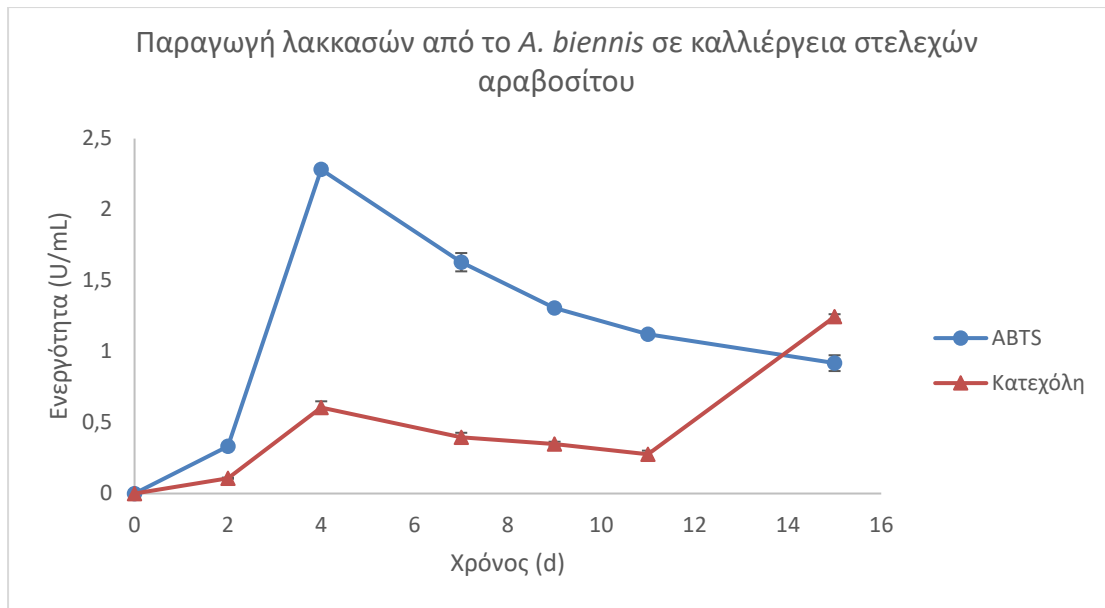


Διάγραμμα 13. Σχετική έκφραση των εκκρινόμενων ενζύμων του *A. biennis* σε καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου σε σύγκριση με καλλιέργειες ξυλόζης

Ός προς το σύνολο των εκκρινόμενων ενζύμων, το 5% εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στις καλλιέργειες ξυλόζης, το 20% υπερεκφράζεται στις καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου, ενώ για το υπόλοιπο 75% δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο υποστρωμάτων. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις υδρολάσες, το μεγαλύτερο ποσοστό δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο υποστρώματα. Για τις εστεράσες, το 29% υπερεκφράζεται στις καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου, ενώ χαρακτηριστικά η οικογένεια CE16, η οποία περιλαμβάνει εστεράσες του οξικού οξέος, δεν ανιχνεύεται καθόλου στις καλλιέργειες ξυλόζης. Τέλος, όσον αφορά τα ένζυμα με οξειδοαναγωγική δράση, κανένα δεν υποεκφράζεται, ενώ το 53% εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στις καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου, με την οικογένεια AA9, η οποία περιλαμβάνει μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών, να μην ανιχνεύεται καθόλου στις καλλιέργειες ξυλόζης.

3.4 Απομόνωση και καθαρισμός των ενζύμων *AbiLac1* και *AbiLac2*

Για τον καθαρισμό των λακκασών χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας του μύκητα *A. biennis* σε υπόστρωμα στελεχών αραβοσίτου. Στο Διάγραμμα 14 παρουσιάζεται το προφίλ παραγωγής λακκασών στη συγκεκριμένη καλλιέργεια, με υπολογισμό της ενεργότητας των ενζύμων αυτών με χρήση τόσο του ABTS, όσο και της κατεχόλης ως υπόστρωμα.

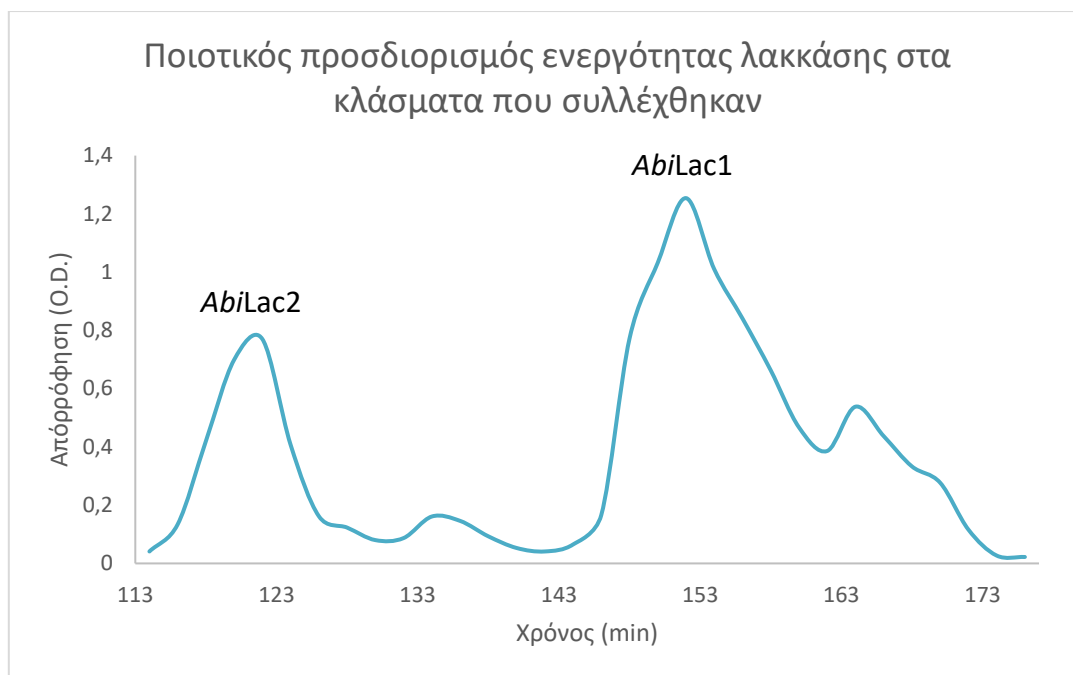


Διάγραμμα 14. Η ενεργότητα των λακκασών (Units/mL) ως συνάρτηση του χρόνου ανάπτυξης του *A. biennis* σε καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου, μετρούμενη χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά υποστρώματα

Από τη διαγραμματική απεικόνιση των ενεργοτήτων παρατηρείται μέγιστο στην ενεργότητα των λακκασών με χρήση του ABTS την 4^η ημέρα της καλλιέργειας, με ακολουθούμενη σταδιακή πτώση. Αντίθετα, στην περίπτωση της κατεχόλης, ενώ παρατηρείται τοπικό μέγιστο της ενεργότητας την 4^η ημέρα της καλλιέργειας, η ενεργότητα λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της την 15^η ημέρα, ξεπερνώντας την αντίστοιχη τιμή για το ABTS. Το διαφορετικό προφίλ παραγωγής των ενζύμων με τη χρήση των δύο υποστρωμάτων υποδεικνύει την έκφραση πολλαπλών λακκασών από τον μικροοργανισμό. Με δεδομένο ότι το ABTS αποτελεί ένα υπόστρωμα που οξειδώνεται εύκολα, ενώ η κατεχόλη πιο δύσκολα, επιλέχθηκε η 15^η ημέρα ως το τέλος της καλλιέργειας με σκοπό την απομόνωση των λακκασών από το υπερκείμενο υγρό αυτής.

3.4.1 Απομόνωση λακκασών με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Για την απομόνωση των δύο λακκασών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, η οποία περιγράφηκε στην Ενότητα 2.2.6.3. Για τον προσδιορισμό των κλασμάτων που περιέχουν ένζυμα με ενεργότητα λακκάσης πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανίχνευση της ενεργότητάς τους χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την κατεχόλη. Στο Διάγραμμα 15 παρουσιάζονται οι απορροφήσεις που μετρήθηκαν στα 450 nm μετά το πέρας της αντίδρασης με την κατεχόλη ως προς τον χρόνο συλλογής κάθε κλάσματος. Ως χρόνος 0 θεωρείται η έναρξη της συλλογής των κλασμάτων.



Διάγραμμα 15. Απορρόφηση αντιδράσεων των συλλεχθέντων κλασμάτων με την κατεχόλη ως προς τον χρόνο της συλλογής του κλάσματος

Από τα αποτελέσματα των απορροφήσεων των αντιδράσεων εξάγεται το συμπέρασμα πως εκλούνται δύο διαφορετικές λακκάσες, λόγω της ύπαρξης δύο μεγάλων κορυφών. Έτσι, τα κλάσματα που συλλέχθηκαν στο χρονικό διάστημα 120 έως 123 min (κλάσματα 60 και 61), καθώς και τα κλάσματα που συλλέχθηκαν στο χρονικό διάστημα 150 έως 155 min (κλάσματα 75, 76 και 77), ενώθηκαν και αποθηκεύτηκαν ξεχωριστά. Το πρώτο κλάσμα που αφορούσε τη μικρότερη κορυφή είχε συνολικό όγκο 18 mL, ενώ το δεύτερο κλάσμα που αφορούσε τη μεγαλύτερη κορυφή είχε συνολικό όγκο 26 mL.

Σημειώνεται ότι το πρώτο κλάσμα, το οποίο αφορούσε τη χαμηλή κορυφή, αντιστοιχεί στη λακκάση *AbiLac2*, ενώ το κλάσμα, το οποίο αφορούσε τη μεγαλύτερη κορυφή, αντιστοιχεί στη λακκάση *AbiLac1*.

Πίνακας 8. Καθαρισμός λακκασών *AbiLac1* και *AbiLac2*

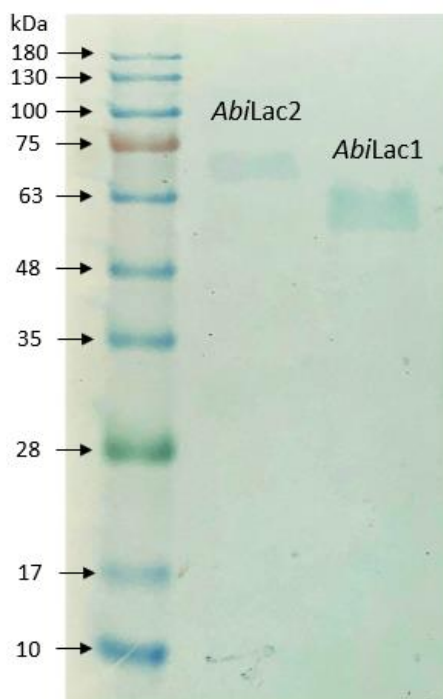
	<i>AbiLac1</i>			<i>AbiLac2</i>		
	Units/mg	Καθαρισμός (fold)	Απόδοση (%)	Units/mg	Καθαρισμός (fold)	Απόδοση (%)
Ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα	0,38	1	100	0,38	1	100
Q-sepharose	4,39	11,62	20,35	1,40	3,70	5,77

Επισημαίνεται ότι οι χαμηλές αποδόσεις του καθαρισμού οφείλονται στην ύπαρξη πολλών λακκασών στο εξωκυτταρικό εκχύλισμα του μικροοργανισμού, από τις οποίες μόνο 2 απομονώθηκαν. Έτσι, η αρχική ενεργότητα που μετρήθηκε στο

ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα αντιστοιχεί στο σύνολο των παραγόμενων λακκασών, οδηγώντας, έτσι, σε χαμηλές τιμές απόδοσης.

3.4.2 Αποτελέσματα ηλεκτροφορητικών τεχνικών

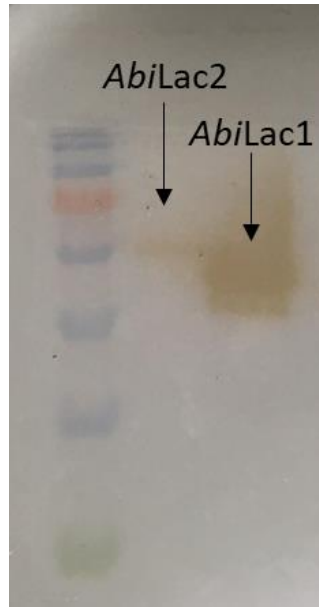
Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των πρωτεϊνικών μορίων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου SDS-PAGE. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε για τα συμπυκνωμένα κλάσματα που συλλέχθηκαν (που περιείχαν τα ένζυμα *AbiLac1* και *AbiLac2*) καθώς και για πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνικών μορίων γνωστού μοριακού βάρους. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE παρουσιάζονται στην Εικόνα 26.



Εικόνα 26. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE. Από αριστερά προς τα δεξιά, διακρίνεται η πρωτεϊνική ζώνη της λακκάσης *AbiLac1*, η πρωτεϊνική ζώνη της λακκάσης *AbiLac2* και το πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους.

Στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE διακρίνεται για κάθε ένζυμο μία πρωτεϊνική ζώνη, γεγονός που αποδεικνύει την καθαρότητα της πρωτεΐνης. Το μοριακό βάρος της λακκάσης *AbiLac1* εντοπίζεται στα 63 kDa, ενώ της λακκάσης *AbiLac2* περίπου στα 70 kDa.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση απουσία αποδιατακτικών συνθηκών επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι εμφανίζεται μία και μόνο πρωτεϊνική ζώνη με ενεργότητα λακκάσης για κάθε ένζυμο. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης Native-PAGE παρουσιάζονται στην Εικόνα 27.



Εικόνα 27. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών απουσία αποδιατακτικών συνθηκών Native-PAGE. Από αριστερά προς τα δεξιά, διακρίνεται η λακκάση *AbiLac1*, η λακκάση *AbiLac2* και το πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους

Από το ζυμογράφημα της Εικόνας 27 παρατηρείται ότι η λακκάση *AbiLac1* δε δίνει μία πρωτεϊνική ζώνη, με τον χρωματισμό λόγω της οξείδωσης της κατεχόλης να εξαπλώνεται, γεγονός που οφείλεται στην υψηλή ενεργότητα και πρωτεϊνική συγκέντρωση της συγκεκριμένης λακκάσης.

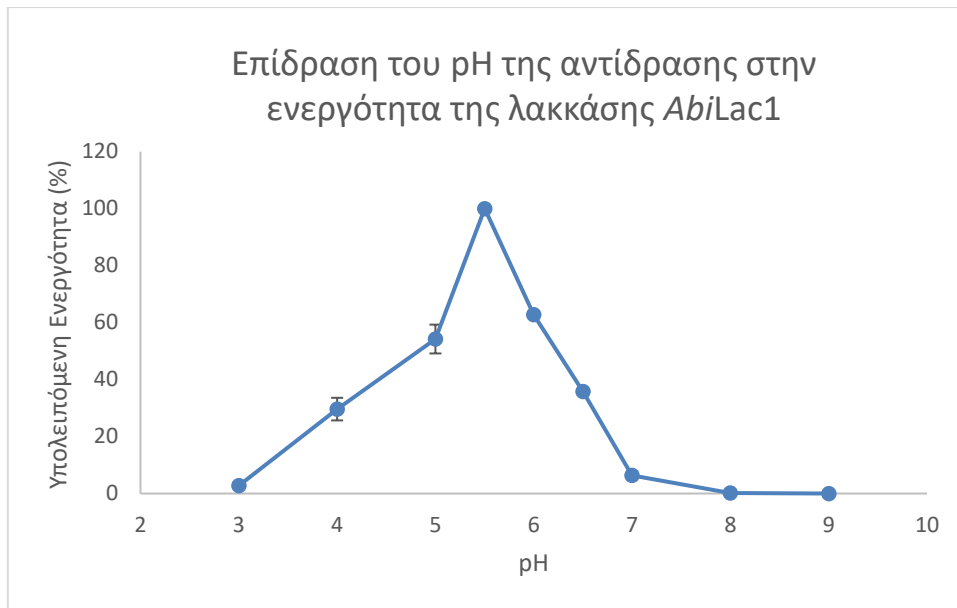
Τονίζεται ότι η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα για το μοριακό βάρος των ενζύμων, ωστόσο η ηλεκτροφόρηση Native-PAGE επιβεβαιώνει το γεγονός ότι εμφανίζεται μία και μόνο πρωτεϊνική ζώνη με ενεργότητα λακκάσης.

3.5 Χαρακτηρισμός καθαρών ενζύμων *AbiLac1* και *AbiLac2*

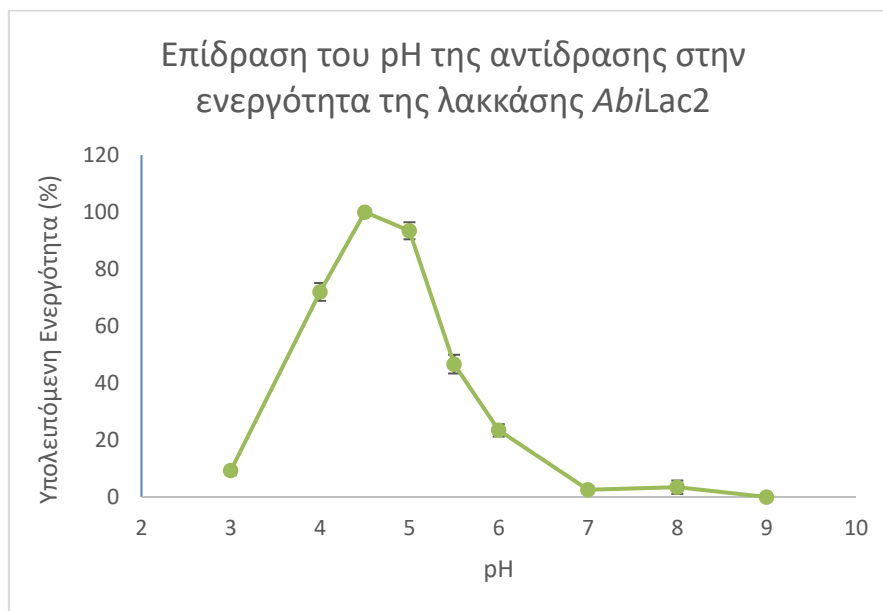
3.5.1 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών δράσης

3.5.1.1 Βέλτιστο pH δράσης

Στα Διαγράμματα 16 και 17 παρουσιάζονται οι υπολογιζόμενες υπολειπόμενες ενεργότητες για την κάθε λακκάση, κατά τη διεξαγωγή αντιδράσεων σε διαφορετικές συνθήκες pH, στο εύρος pH 3 έως 9.



Διάγραμμα 16. Επίδραση της τιμής pH της αντίδρασης στην υπολειπόμενη ενεργότητα της λακκάσης *AbiLac1*



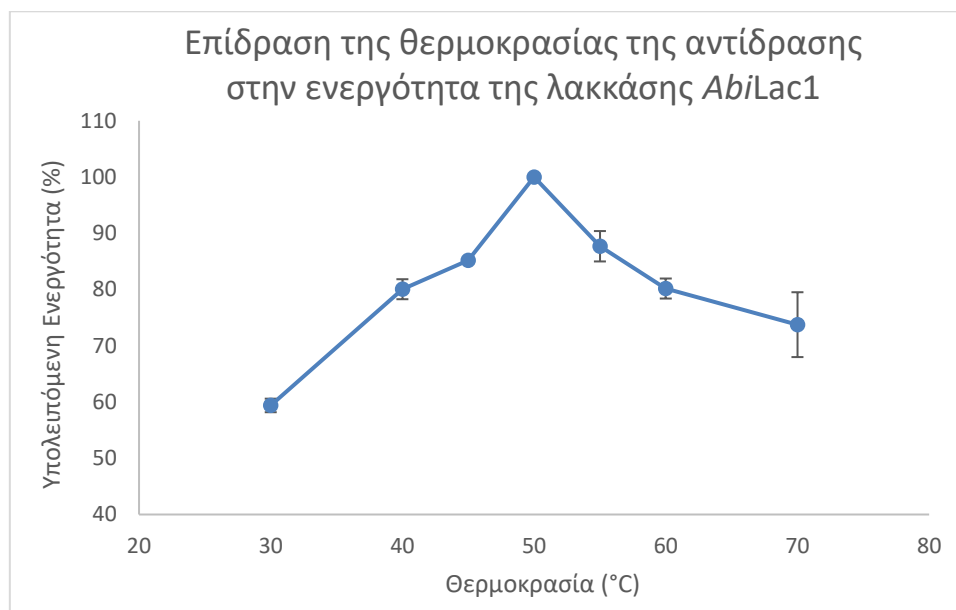
Διάγραμμα 17. Επίδραση της τιμής pH της αντίδρασης στην υπολειπόμενη ενεργότητα της λακκάσης *AbiLac2*

Η λακκάση *AbiLac1* εμφανίζει βέλτιστο pH δράσης στην τιμή 5,5. Η ενεργότητα του ενζύμου διατηρείται σε ποσοστό άνω του 50% στο εύρος pH 5 έως 6, για τις τιμές pH 4 και 6,5 η ενεργότητα κυμαίνεται μεταξύ του 30 και 40%, ενώ για την τιμή pH 3 και για τιμές μεγαλύτερες του 7 η ενεργότητα σχεδόν μηδενίζεται. Αντίστοιχα, η λακκάση *AbiLac2* εμφανίζει βέλτιστο pH δράσης στην τιμή 4,5. Η ενεργότητα του ενζύμου διατηρείται σε ποσοστό άνω του 70% στο εύρος pH 4 έως 5, για την τιμή pH 5,5 η ενεργότητα διατηρείται άνω του 40%, για τις τιμές pH 3 και 6 η ενεργότητα κυμαίνεται από 10 έως 25%, ενώ για τιμές pH μεγαλύτερες του 7 η ενεργότητα σχεδόν μηδενίζεται. Και τα δύο ένζυμα χάνουν την ενεργότητά τους σε μεγάλο ποσοστό για

τιμές pH 3 και μεγαλύτερες του 7, με την *AbiLac1* να εμφανίζει καλύτερη δραστικότητα στο εύρος pH 5-6, ενώ η *AbiLac2* στο εύρος 4-5.

3.5.1.2 Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης

Στα Διαγράμματα 18 και 19 παρουσιάζονται οι υπολογιζόμενες υπολειπόμενες ενεργότητες για την κάθε λακκάση, κατά τη διεξαγωγή αντιδράσεων σε διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες, στο εύρος 30 έως 70°C. Σημειώνεται πως οι αντιδράσεις για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της λακκάσης *AbiLac1* πραγματοποιήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών pH 5,5, ενώ της λακκάσης *AbiLac2* με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών pH 4,5.



Διάγραμμα 18. Επίδραση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στην υπολειπόμενη ενεργότητα της λακκάσης *AbiLac1*



Διάγραμμα 19. Επίδραση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στην υπολειπόμενη ενεργότητα της λακκάσης *AbiLac2*

Η λακκάση *AbiLac1* εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 50°C. Η ενεργότητα του ενζύμου διατηρείται σε ποσοστό 80% και άνω στο εύρος 40 έως 60°C, ενώ για τις ακραίες τιμές 30 και 70°C η ενεργότητα διατηρείται σε ποσοστό 60% και 75%, αντίστοιχα. Από την άλλη μεριά, η λακκάση *AbiLac2* εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στο εύρος 60 έως 65°C. Η ενεργότητα του ενζύμου διατηρείται σε ποσοστό 80% και άνω στο εύρος 55 έως 70°C, στους 40°C η ενεργότητα διατηρείται άνω του 40%, ενώ για τη θερμοκρασία 30°C η ενεργότητα διατηρείται σε ποσοστό 20%. Παρατηρείται ότι η λακκάση *AbiLac1* διατηρεί την ενεργότητά της σε ποσοστό 60% και άνω σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών που μελετήθηκαν, εμφανίζοντας μεγαλύτερη δραστηριότητα στο εύρος 40 έως 60°C. Αντίστοιχα, η λακκάση *AbiLac2* χάνει σημαντικό μέρος της ενεργότητάς της (>50%) σε θερμοκρασίες από 40°C και κάτω, εμφανίζοντας μεγαλύτερη δραστηριότητα στο εύρος 55 έως 70°C.

Στον Πίνακα 9 συνοψίζονται οι βέλτιστες συνθήκες δράσης των δύο καθαρών ενζύμων.

Πίνακας 9. Βέλτιστες συνθήκες pH και θερμοκρασίας δράσης των δύο καθαρών λακκασών

Ένζυμο	Βέλτιστο pH	Βέλτιστη θερμοκρασία
<i>AbiLac1</i>	5,5	50°C
<i>AbiLac2</i>	4,5	60-65°C

3.5.2 Αξιολόγηση οξειδωσης υποστρωμάτων

Στο συγκεκριμένο πείραμα, ως αποτέλεσμα ελήφθησαν τα φάσματα απορρόφησης από τα 220 ως τα 800 nm, για την οξείδωση του κάθε υποστρώματος από καθένα από τα καθαρά ένζυμα. Τα φάσματα αυτά ελήφθησαν στους χρόνους 0, 6 h και 24 h. Από τις τιμές απορρόφησης της κάθε αντίδρασης στα διάφορα μήκη κύματος, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα του φάσματος απορρόφησης για κάθε υπόστρωμα και κάθε ένζυμο στους τρεις αυτούς χρόνους. Τα φάσματα απορρόφησης ύστερα από 24 h επώασης παρουσιάζονται στο Παράρτημα Α.

Από τα UV-Vis φάσματα απορρόφησης διακρίνεται το εύρος των υποστρωμάτων που οξειδώνεται από κάθε ένζυμο. Στον Πίνακα 10 συνοψίζονται τα υποστρώματα που εξετάστηκαν και επισημαίνεται ποια εξ αυτών οξειδώνονται από τις λακκάσες *AbiLac1* και *AbiLac2*, και σε τι βαθμό, συγκρίνοντας τη διαφορά στις απορροφήσεις των «τυφλών» αντιδράσεων και εκείνων στις οποίες συμμετείχε το κάθε ένζυμο, ύστερα από 24ωρη επώαση. Συγκεκριμένα, το (-) συμβολίζει την απουσία οξείδωσης του υποστρώματος, το (±) την ύπαρξη ασάφειας σχετικά με την οξείδωση ή όχι του υποστρώματος, ενώ τα (+), (++) και (+++) συμβολίζουν διαφορά στις απορροφήσεις μεγαλύτερη 1, 2 και 3 μονάδων, αντίστοιχα.

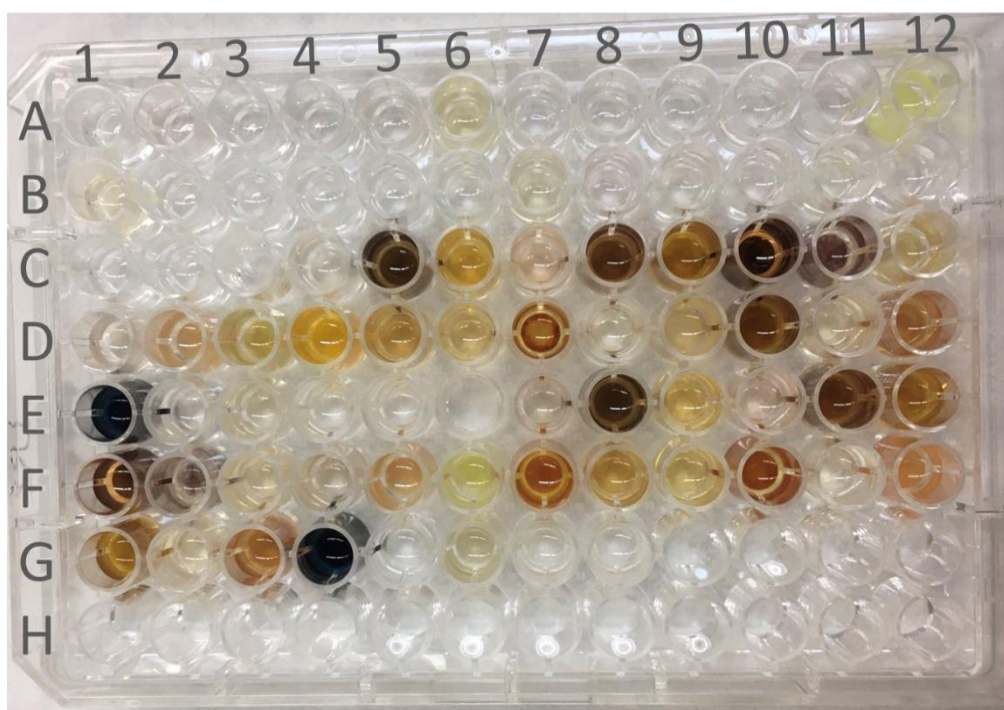
Πίνακας 10. Οξειδωση υποστρωμάτων από τις λακκάσες *AbiLac1* και *AbiLac2*

a/a	Υπόστρωμα	<i>AbiLac1</i>	<i>AbiLac2</i>
Υδροξυβενζόλες			
1	Φαινόλη	-	±
2	Κατεχόλη	+++	+++
3	Ρεσορκινόλη	+++	+++
4	Υδροκινόνη	+++	+++
5	Χλωροκατεχόλη	+++	+++
6	Πυρογαλλόλη	+++	+++
Μεθοξυφαινόλες			
7	Γουαϊακόλη	+++	++
8	2,6-Διμεθοξυφαινόλη	+	+
Αρωματικές αλκοόλες			
9	3,4-Διμεθοξυβενζυλική αλκοόλη	±	±
Αρωματικές αμίνες			
10	Ανιλίνη	±	±
Φαινολικές αλδεΐδες			
11	Βανιλίνη	+	+
Φλαβονοειδή			
12	Κερσετίνη	+++	+++
13	Κατεχίνη	+++	+++
Υδροξυκινναμικά οξέα			
14	Καφεϊκό οξύ	+	+
15	Φερουλικό οξύ	+	+
16	Σιναπικό οξύ	++	++
17	π-Κουμαρικό οξύ	++	++
Υδροξυβενζοϊκά οξέα			
18	Βανιλλικό οξύ	+++	+++
19	Γαλλικό οξύ	+++	+++
20	π-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	-	±
21	Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	+++	+++
Αρωματικές αζο-ενώσεις			
22	ABTS	+++	+++
Λοιπά οξέα			
23	Ασκορβικό οξύ	+++	+++
Κρεσόλες			
24	ο-Κρεσόλη	-	±
25	μ-Κρεσόλη	±	±
26	π-Κρεσόλη	+	+

Από τα 26 εξεταζόμενα υποστρώματα, οι λακκάσες *AbiLac1* και *AbiLac2* κατάφεραν να οξειδώσουν αδιαμφισβήτητα 19 και 20 ενώσεις, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, και τα δύο ένζυμα οξείδωσαν σε μεγάλο βαθμό υδροξυβενζόλες, όπως την κατεχόλη, την

υδροκινόνη, την χλωροκατεχόλη και την πυρογαλλόλη, τη γουαϊακόλη, φλαβονοειδή, όπως την κερσετίνη και την κατεχίνη, υδροξυβενζοϊκά οξέα, όπως το βανιλλικό, το γαλλικό και το πρωτοκατεχουϊκό οξύ, αλλά και το ABTS και το ασκορβικό οξύ. Ενώσεις όπως η φαινόλη και το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ δεν οξειδώθηκαν από την *AbiLac1*, ενώ εμφάνισαν μικρή μεταβολή στο UV-Vis φάσμα τους κατά τη δράση της *AbiLac2*. Ως προς τις κρεσόλες, η λακκάση *AbiLac1* οδήγησε σε μικρή μεταβολή του φάσματος της μ-κρεσόλης, οξειδώνοντας την π-κρεσόλη, ενώ η *AbiLac2* οδήγησε σε μικρή μεταβολή του φάσματος των όρθο- και μέτα- υποκατεστημένων κρεσολών, επιτυγχάνοντας, επίσης, οξείδωση της π-κρεσόλης. Τα καθαρά, λοιπόν, ένζυμα επέδειξαν μεγάλη οξειδωτική ικανότητα, τόσο έναντι υποστρωμάτων που οξειδώνονται συνήθως από λακκάσες, όπως οι υδροξυβενζόλες και η γουαϊακόλη, αλλά και έναντι πιο ανθεκτικών στην οξείδωση υποστρωμάτων. Αρωματικές ενώσεις με ένα μόνο υδροξύλιο χωρίς άλλους υποκαταστάτες και ενώσεις απουσία υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο φαίνεται να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην οξείδωση. Συγκριτικά οι δύο λακκάσες φαίνεται να έχουν παρόμοια συμπεριφορά απέναντι σε 21 υποστρώματα, με την *AbiLac2* να εμφανίζει, ωστόσο, μεγαλύτερη οξειδωτική δράση ως προς τη φαινόλη, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ και την ο-κρεσόλη.

Επιπλέον, η οξείδωση των υποστρωμάτων καθίσταται ορατή στις περιπτώσεις που το οξειδωμένο προϊόν εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στο εύρος 400 έως 700 nm, όπως φαίνεται από την εικόνα των «πηγαδιών» μέσα στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Οι αντιδράσεις οξείδωσης μετά το πέρας 24 ωρών

3.5.3 Μελέτη εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα

Ως αποτέλεσμα στις συγκεκριμένες μετρήσεις ελήφθησαν οι απορροφήσεις των αντιδράσεων οξείδωσης σε καθορισμένο χρόνο αντίδρασης για κάθε υπόστρωμα και

κάθε ένζυμο, στις βέλτιστες συνθήκες pH και θερμοκρασίας για την *AbiLac1* και την *AbiLac2*, αντίστοιχα. Από τον νόμο των Lambert-Beer προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του οξειδωμένου προϊόντος με βάση τη διαφορά απορρόφησης μεταξύ της αντίδρασης και του «τυφλού» διαλύματος, και στη συνέχεια υπολογίστηκε η μέση ενεργότητα του ενζύμου σε Units/mg, αφού προηγουμένως είχε υπολογισθεί για κάθε ένζυμο η πρωτεϊνική του συγκέντρωση με τη μέθοδο Lowry. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

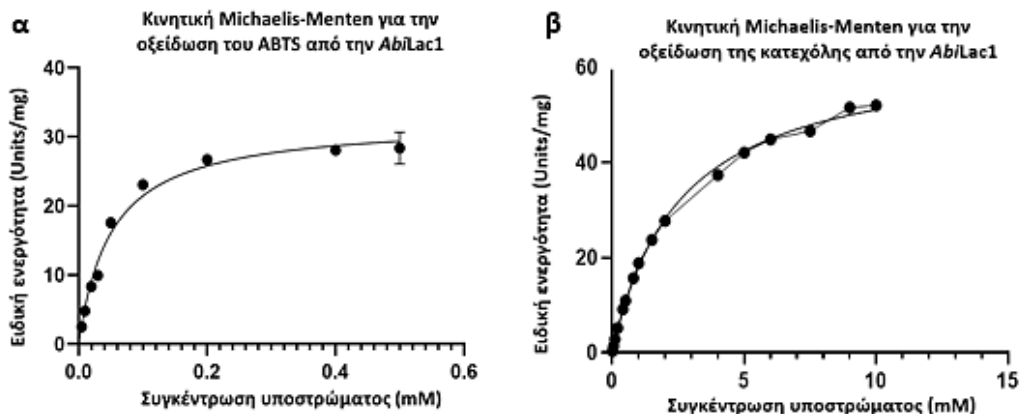
Πίνακας 11. Ειδική ενζυμική ενεργότητα (Units/mg) των δύο ενζύμων

Υπόστρωμα	<i>AbiLac1</i> (Units/mg)	<i>AbiLac2</i> (Units/mg)
ABTS	61 ± 1	31 ± 1
Κατεχόλη	43,6 ± 0,4	16,1 ± 0,2
Γουαϊακόλη	15,71 ± 0,06	7,1 ± 0,2
2,6-DMP	24 ± 1	13 ± 2
Πυρογαλλόλη	10,7 ± 0,4	5,90 ± 0,07

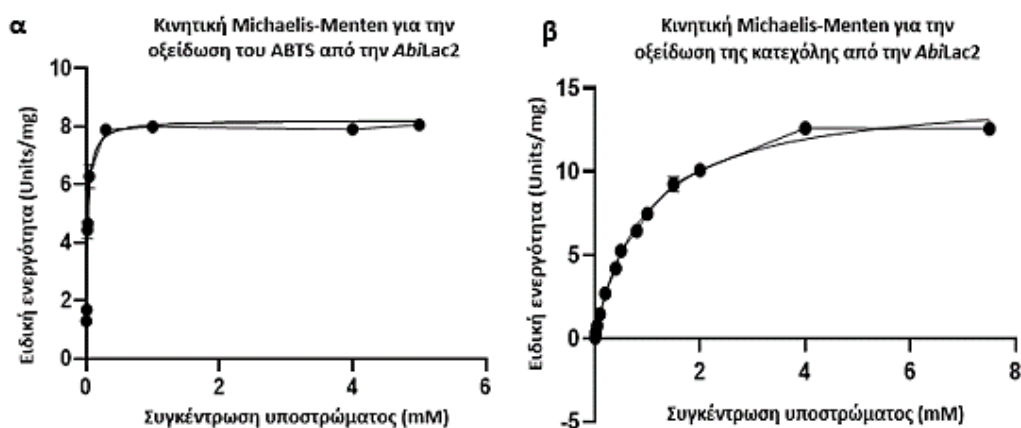
Από τα υπό μελέτη υποστρώματα, η λακκάση *AbiLac1* δίνει τη μεγαλύτερη ενεργότητα για το ABTS, ακολουθούμενο από την κατεχόλη. Ακολουθεί το υπόστρωμα 2,6-DMP, η γουαϊακόλη και, τέλος, η πυρογαλλόλη. Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με την ενεργότητα του ενζύμου για το ABTS, η ενεργότητα για την κατεχόλη ισούται περίπου με το 70% αυτής, εκείνη για τη 2,6-DMP με το 40% αυτής, για τη γουαϊακόλη με το 26% αυτής, ενώ για την πυρογαλλόλη με το 18% αυτής. Στην περίπτωση της λακκάσης *AbiLac2*, το ένζυμο παρουσιάζει παρόμοια σειρά προτίμησης. Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με την ενεργότητα του ενζύμου για το ABTS, η ενεργότητα για την κατεχόλη ισούται περίπου με το 51% αυτής, εκείνη για τη 2,6-DMP με το 42% αυτής, ενώ για τη γουαϊακόλη και την πυρογαλλόλη με το 23% και 19% αυτής, αντίστοιχα. Επομένως, τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν προτίμηση ως προς τις υδροξυβενζόλες με έναν υποκαταστάτη υδροξυλίου στην όρθο- θέση, ακολουθούν οι υδροξυβενζόλες με δύο μεθοξυ-ομάδες σε όρθο- θέση, οι υδροξυβενζόλες με μία μεθοξυ-ομάδα σε όρθο- θέση, και τέλος οι υδροξυβενζόλες με δύο υποκαταστάτες υδροξυλίου σε όρθο-θέση. Για όλα τα υποστρώματα παρατηρείται μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα στην περίπτωση της *AbiLac1*. Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με την αντίστοιχη ενεργότητα της *AbiLac2*, η ειδική ενεργότητα της *AbiLac1* είναι περίπου 2 φορές μεγαλύτερη για το ABTS, 2,7 φορές μεγαλύτερη για την κατεχόλη, 1,8 φορές μεγαλύτερη για τη 2,6-DMP, 2,2 φορές μεγαλύτερη για τη γουαϊακόλη και 1,8 φορές μεγαλύτερη για την πυρογαλλόλη.

3.5.4 Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Michaelis-Menten

Για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών Michaelis-Menten υπολογίστηκαν οι τιμές ειδικής ενεργότητας (Units/mg) του κάθε ενζύμου για τις διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, τόσο για το ABTS όσο και για την κατεχόλη. Τα δεδομένα προσαρμόστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού GraphPad Prism 5 στο μοντέλο Michaelis-Menten, όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 20 και 21.



Διάγραμμα 20. Προσαρμογή δεδομένων στο μοντέλο Michaelis-Menten για την οξείδωση του υποστρώματος ABTS ($R^2=0,982$) (α) και της κατεχόλης ($R^2=0,998$) (β) από την λακκάση *AbiLac1*



Διάγραμμα 21. Προσαρμογή δεδομένων στο μοντέλο Michaelis-Menten για την οξείδωση του υποστρώματος ABTS ($R^2=0,970$) (α) και της κατεχόλης ($R^2=0,995$) (β) από την λακκάση *AbiLac2*

Από την προσαρμογή των δεδομένων λαμβάνονται τα κινητικά μεγέθη K_M και v_{max} . Το μέγεθος k_{cat} υπολογίζεται ως το γινόμενο του v_{max} με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Το μοριακό βάρος για την λακκάση *AbiLac1* είναι 63000 mg/mmol, ενώ για την *AbiLac2* 70000 mg/mmol. Τα κινητικά μεγέθη παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

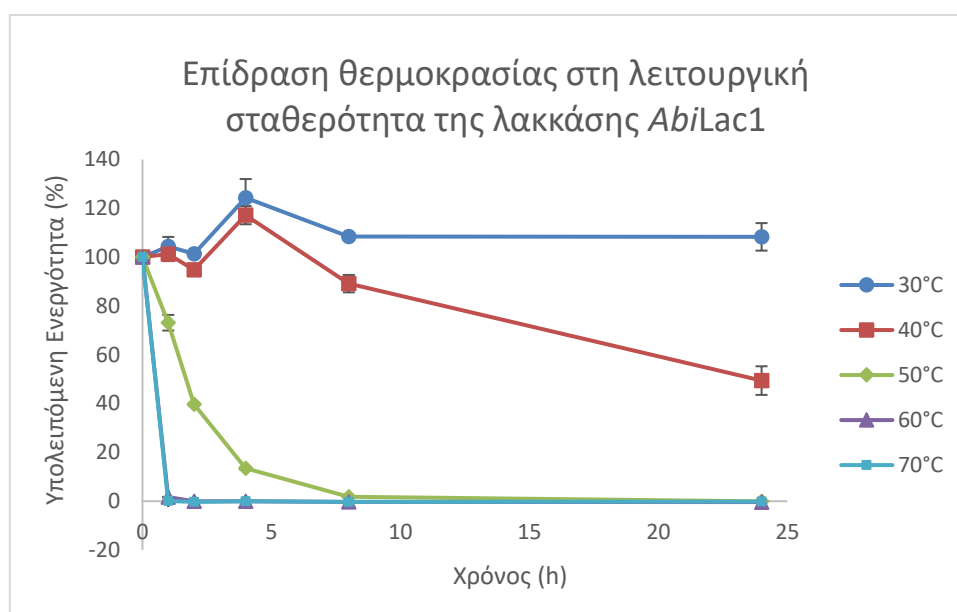
Πίνακας 12. Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Michaelis-Menten για τις δύο λακκάσες και τα αντίστοιχα υποστρώματα

Ένζυμο	Υπόστρωμα	K_M (μM)	v_{max} (Units/mg)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} min^{-1}$)
<i>AbiLac1</i>	ABTS	51 ± 5	$32,3 \pm 0,9$	2037 ± 57	40 ± 4
	Κατεχόλη	2565 ± 87	$64,3 \pm 0,8$	4051 ± 49	$1,58 \pm 0,06$
<i>AbiLac2</i>	ABTS	22 ± 2	$8,2 \pm 0,2$	575 ± 12	26 ± 3
	Κατεχόλη	942 ± 43	$14,7 \pm 0,2$	1032 ± 17	$1,10 \pm 0,05$

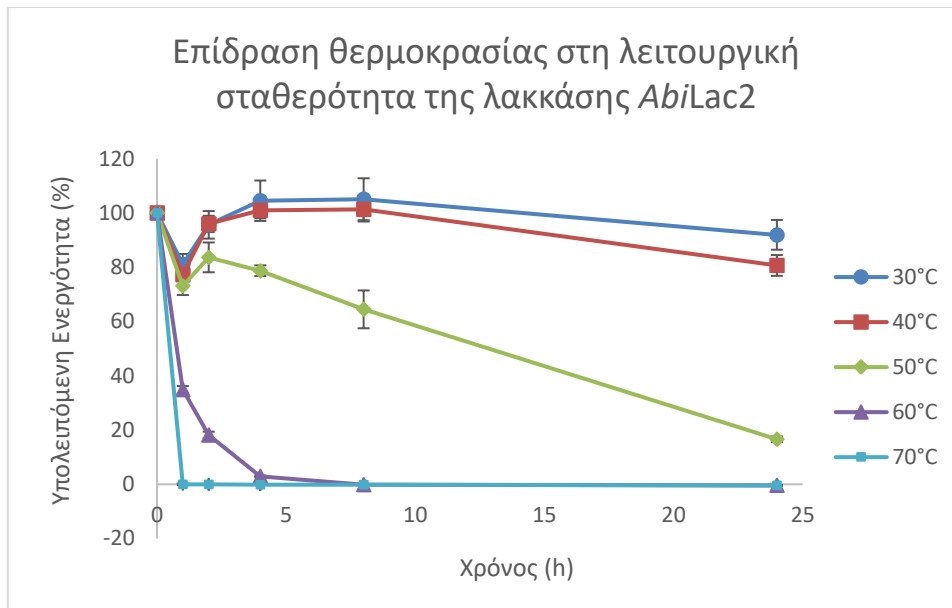
Συγκρίνοντας τα δύο υποστρώματα, τόσο η λακκάση *AbiLac1* όσο και η *AbiLac2* δίνουν υψηλότερες τιμές K_M για την κατεχόλη, φανερώνοντας υψηλότερη συγγένεια των ενζύμων αυτών με το ABTS, ενώ αντίστοιχη συμπεριφορά εμφανίζουν και οι τιμές της v_{max} . Όσον αφορά τον λόγο k_{cat}/K_M , χαμηλότερες τιμές παρατηρούνται για την κατεχόλη και από τα δύο ένζυμα, φανερώνοντας μεγαλύτερη καταλυτική αποδοτικότητα των ενζύμων κατά την οξείδωση του ABTS. Συγκρίνοντας τις δύο λακκάσες, η *AbiLac2* φαίνεται να έχει υψηλότερη συγγένεια ως προς τα δύο υποστρώματα, σε σχέση με την *AbiLac1*.

3.5.5 Μελέτη θερμοκρασιακής σταθερότητας

Στα Διαγράμματα 22 και 23 παρουσιάζονται οι υπολογιζόμενες υπολειπόμενες ενεργότητες για την κάθε λακκάση, κατά την επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες, στο εύρος 30 έως 70°C. Σημειώνεται πως οι αντιδράσεις για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της λακκάσης *AbiLac1* πραγματοποιήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών pH 5,5, ενώ της λακκάσης *AbiLac2* με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικών pH 4,5. Ως 100% ενεργότητα ορίζεται η ενεργότητα του ενζύμου για χρόνο επώασης 0.



Διάγραμμα 22. Επίδραση της θερμοκρασίας στη λειτουργική σταθερότητα της λακκάσης *AbiLac1*



Διάγραμμα 23. Επίδραση της θερμοκρασίας στη λειτουργική σταθερότητα της λακκάσης *AbiLac2*

Από τη διαγραμματική απεικόνιση των υπολειπόμενων ενεργοτήτων εξάγεται το συμπέρασμα πως η σταθερότητα των ενζύμων αυξάνεται μειούμενης της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, η μέγιστη σταθερότητα των ενζύμων λαμβάνεται κατόπιν επώασης στις χαμηλότερες θερμοκρασίες (30 και 40°C), όπου τα ένζυμα διατηρούν την ενεργότητά τους σε ποσοστό 80% και άνω, για τις πρώτες 8 ώρες επώασης. Ύστερα από 24 ώρες επώασης, η λακκάση *AbiLac1* δεν εμφανίζει απώλεια ενεργότητας για τους 30°C, ενώ στην περίπτωση των 40°C η ενεργότητά της μειώνεται στο 50%. Από την άλλη μεριά, η ενεργότητα της λακκάσης *AbiLac2* μειώνεται στο 90 και 80%, ύστερα από 24ωρη επώαση στους 30 και 40°C, αντίστοιχα. Ως προς τις υπόλοιπες θερμοκρασίες, η ενεργότητα της λακκάσης *AbiLac1* παρουσιάζει ομαλή πτωτική πορεία κατά την επώαση του ενζύμου στους 50°C, εμφανίζοντας απώλεια 25% ύστερα από 1 h επώασης, 60% ύστερα από 2 h, 85% ύστερα από 4 h και σχεδόν 100% ύστερα από 8 h. Για επώαση στους 60 και 70°C, η ενεργότητα της *AbiLac1* μηδενίζεται από την πρώτη κιόλας ώρα επώασης. Στην περίπτωση της λακκάσης *AbiLac2*, η ενεργότητα του ενζύμου διατηρείται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60% ύστερα από 8 h επώασης στους 50°C, ενώ μειώνεται στο 15% ύστερα από 24 h. Για επώαση στους 60°C, η λακκάση εμφανίζει απώλεια ενεργότητας σε ποσοστό 65% ύστερα από 1 h επώασης, 80% ύστερα από 2 h και σχεδόν 100% ύστερα από 4 h. Για επώαση στους 70°C, η ενεργότητα της *AbiLac2* μηδενίζεται από την πρώτη κιόλας ώρα επώασης. Συγκρίνοντας τις δύο λακκάσες, η *AbiLac2* δείχνει μεγαλύτερη σταθερότητα από την *AbiLac1* σε όλο το εύρος θερμοκρασιών επώασης.

3.6 Αξιοποίηση των καθαρών ενζύμων, *AbiLac1* και *AbiLac2*, σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές

3.6.1 Βιομετατροπή της τετρακυκλίνης

Ως αποτέλεσμα της διερεύνησης της εφαρμογής των απομονωμένων λακκασών για τη βιομετατροπή του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη ελήφθησαν τα εμβαδά των κορυφών των χρωματογραφημάτων των αντιδράσεων και, στη συνέχεια, υπολογίστηκαν οι τιμές συγκέντρωσης της τετρακυκλίνης που παρέμεινε στον όγκο της αντίδρασης, σε mg/mL, μέσω του εμβαδού κορυφής των πρότυπων διαλυμάτων τετρακυκλίνης. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης της τετρακυκλίνης κατά τη δράση των δύο ενζύμων σε σύγκριση με τα «τυφλά» διαλύματα, η οποία παρουσιάζεται στον Πίνακα 13.

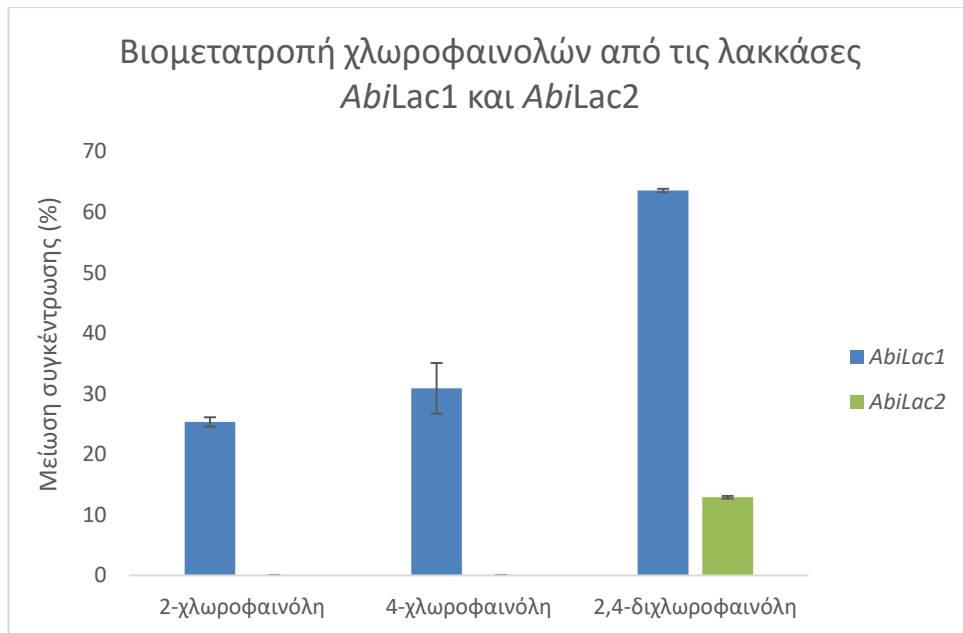
Πίνακας 13. Ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης της τετρακυκλίνης που επιτεύχθηκε με τη δράση των ενζύμων *AbiLac1* και *AbiLac2*

Ένζυμο	Ποσοστιαία Μείωση Συγκέντρωσης Τετρακυκλίνης (%)
<i>AbiLac1</i>	25 ± 2
<i>AbiLac2</i>	-

Μείωση στη συγκέντρωση της τετρακυκλίνης στον όγκο της αντίδρασης επιτυγχάνεται μόνο με τη δράση της λακκάσης *AbiLac1* και συγκεκριμένα σε ποσοστό 25%. Αντίθετα, η δράση του ενζύμου *AbiLac2* δεν οδηγεί σε διάσπαση του αντιβιοτικού.

3.6.2 Βιομετατροπή των χλωροφαινολών

Ως αποτέλεσμα της διερεύνησης της εφαρμογής των απομονωμένων λακκασών για τη βιομετατροπή της 2-χλωροφαινόλης, της 4-χλωροφαινόλης και 2,4-διχλωροφαινόλης ελήφθησαν τα εμβαδά των κορυφών των χρωματογραφημάτων των αντιδράσεων και, στη συνέχεια, υπολογίστηκαν οι τιμές συγκέντρωσης της τετρακυκλίνης που παρέμεινε στον όγκο της αντίδρασης, σε mg/mL, μέσω του εμβαδού κορυφής των πρότυπων διαλυμάτων χλωροφαινολών. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης της κάθε χλωροφαινόλης με τη δράση των δύο ενζύμων σε σύγκριση με τα «τυφλά» διαλύματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 24.



Διάγραμμα 24. Ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης των χλωροφαινολών που επιτεύχθηκε κατά τη δράση των ενζύμων *AbiLac1* και *AbiLac2*

Με τη δράση της λακκάσης *AbiLac1* παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της 2-χλωροφαινόλης στον όγκο της αντίδρασης σε ποσοστό 25%, της 4-χλωροφαινόλης σε ποσοστό 31%, ενώ της 2,4-διχλωροφαινόλης σε ποσοστό 64%. Αντίστοιχα, για τη δράση της λακκάσης *AbiLac2* παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της 2,4-διχλωροφαινόλης σε ποσοστό 13%, ενώ για την 2- και 4-χλωροφαινόλη δεν παρουσιάζεται μεταβολή της συγκέντρωσης. Συγκριτικά για τα δύο ένζυμα, η δράση της *AbiLac1* οδηγεί σε μεγαλύτερη ποσοστιαία διάσπαση των χλωροφαινολών σε σχέση με τη δράση της *AbiLac2*, παρουσιάζοντας προτίμηση στη δι-υποκατεστημένη χλωροφαινόλη.

3.7 Βιοπληροφορική ανάλυση γονιδίων λακκασών

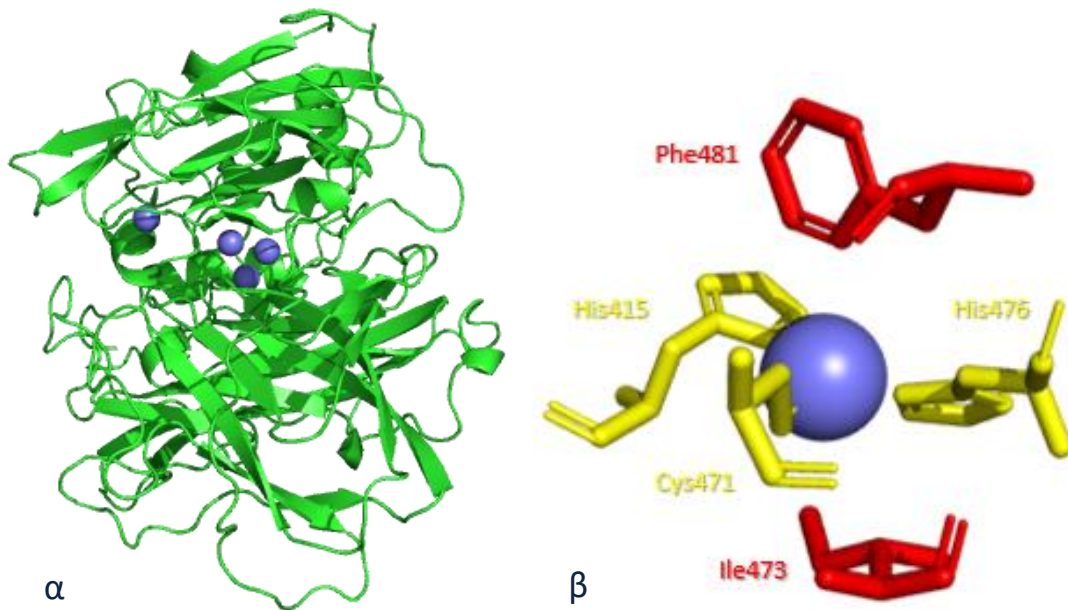
Από το πρωτέωμα του *A. biennis* ξεχώρισαν δύο ένζυμα της οικογένειας AA1 (Protein ID: 557796 και 509913), για τα οποία ανιχνεύτηκε υψηλό ποσοστό των πεπτιδίων και σε μεγάλες ποσότητες. Γίνεται, λοιπόν, η υπόθεση ότι τα δύο αυτά γονίδια αντιστοιχούν στις λακκάσες *AbiLac1* και *AbiLac2* που απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν από τις καλλιέργειες του *A. biennis* σε καλλιέργειες στελεχών αραβοσίτου. Τα γονίδια αυτά αναλύθηκαν με τη βοήθεια βιοπληροφορικών εργαλείων, από τα οποία συλλέχθηκαν πληροφορίες σχετικά με τις φυσικοχημικές και δομικές ιδιότητες των κωδικοποιημένων πρωτεϊνών, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Πρόβλεψη ιδιοτήτων των λακκάσων 557796 και 509913 με χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων

Βιοπληροφορικό εργαλείο	Ιδιότητα	Λακκάση 557796	Λακκάση 509913
ProtParam	Αριθμός αμινοξέων	517	518
SignalP 5.0	Σηματοδοτικό πεπτίδιο έκκρισης	Ναι	Ναι
ProtParam	Μοριακό βάρος (Da)	55593,46	55712,4
ProtParam	Ισοηλεκτρικό σημείο	5,3	4,96
NetNGlyc 1.0	Αριθμός θέσεων N-γλυκοζυλίωσης	3	3
NetOGlyc 4.0	Αριθμός θέσεων O-γλυκοζυλίωσης	8	6

Όσον αφορά τη λακκάση με Protein ID 557796, η ανάλυση της γονιδιακής της αλληλουχίας με τη χρήση του αλγορίθμου BLAST με βάση την τράπεζα δεδομένων UniProtKB/Swiss-Prot, έδειξε 67,12% ομοιότητα με λακκάση του Βασιδιομύκητα *Pleurotus ostreatus*^{102,103}. Το ένζυμο αυτό, αποτελούμενο από 533 αμινοξέα¹⁰³, είναι N-γλυκοζυλιωμένο στο αμινοξύ Asn-467 και έχει ισοηλεκτρικό σημείο 2,9¹⁰². Το βέλτιστο pH δράσης του βρέθηκε ίσο με 3-3,5 για το ABTS και 5-6 για τη γουαϊακόλη, με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 50°C¹⁰². Ως προς τις κινητικές σταθερές, εκείνες υπολογίστηκαν, με βάση το ABTS: $K_M=280 \mu\text{M}$, $k_{cat}/K_M=55,7 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ και $v_{max}=3,6 \mu\text{M}/\text{min}$ ¹⁰².

Με τη βοήθεια του εργαλείου SWISS-MODEL πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη του μοντέλου της δομής της λακκάσης 557796 στον χώρο, με βάση τη λακκάση του μύκητα *Antrodiaella faginea* (PDB: 5EHF), η οποία εμφάνισε ομοιότητα αλληλουχίας 70,04%. Η συγκεκριμένη λακκάση αποτελείται από 497 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 65 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο 4,5, ενώ έχουν βρεθεί 6 πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης¹⁰⁴. Ως προς τις κινητικές σταθερές, εκείνες υπολογίστηκαν, με βάση το ABTS: $K_M=7 \mu\text{M}$, $k_{cat}/K_M=1491,6 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$, και με βάση την κατεχόλη: $K_M=76 \mu\text{M}$, $k_{cat}/K_M=237,6 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$. Η πρόβλεψη της δομής της λακκάσης 557796 παρουσιάζεται στην Εικόνα 29.

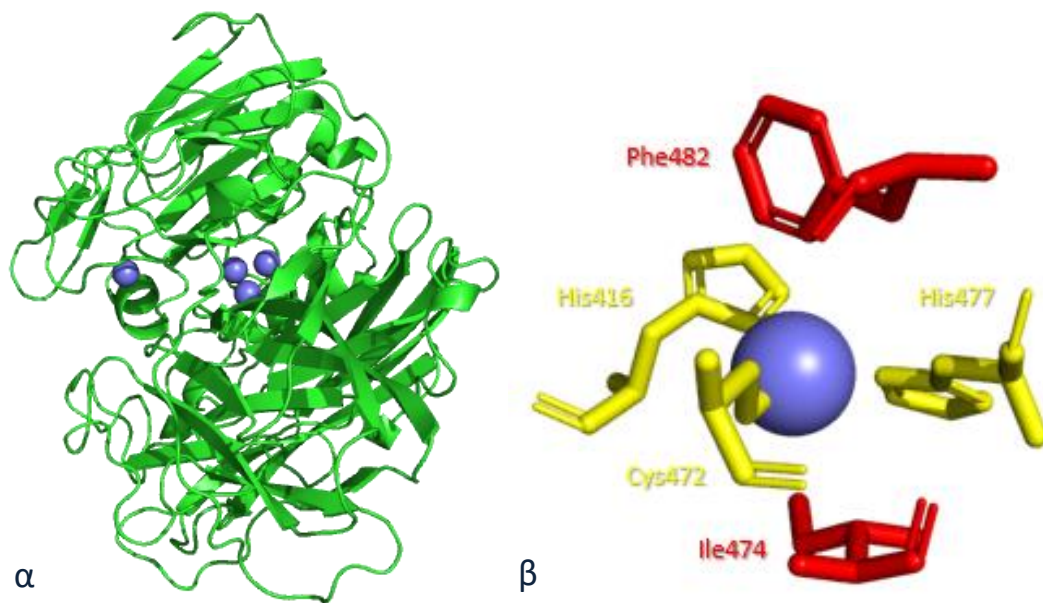


Εικόνα 29. Προβλεπόμενη δομή της λακκάσης 557796 (α) και του ενεργού της κέντρου (β)

Από το μοντέλο που δημιουργήθηκε, φαίνεται πως ο T1 χαλκός που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου συντονίζεται από δύο ιστιδίνες και μία κυστεΐνη, οι οποίες σχηματίζουν ένα επίπεδο, ενώ στον κατακόρυφο άξονα από μία φαινυλαλανίνη, η οποία καθορίζει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ενζύμου.

Όσον αφορά τη λακκάση με Protein ID 509913, η ανάλυση της γονιδιακής της αλληλουχίας με τη χρήση του αλγορίθμου BLAST με βάση την τράπεζα δεδομένων UniProtKB/Swiss-Prot, έδειξε 67,76% ομοιότητα με λακκάση του Βασιδιομύκητα *Rychnororus cinnabarinus*^{105,106}. Το ένζυμο αυτό, αποτελούμενο από 497 αμινοξέα, διαθέτει 6 πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης και έχει μοριακό βάρος 76 kDa¹⁰⁶. Το βέλτιστο pH δράσης του βρέθηκε ίσο με 4 για τη γουαϊακόλη, ενώ φαίνεται να οξειδώνει ένα μεγάλο εύρος ορθο- και παρα- υποκατεστημένων φαινολών, καθώς και αρωματικές αμίνες¹⁰⁵.

Με τη βοήθεια του εργαλείου SWISS-MODEL πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη του μοντέλου της δομής της λακκάσης 509913 στον χώρο, με βάση τη λακκάση του μύκητα *Trametes versicolor* (PDB: 1KYA), η οποία εμφάνισε ομοιότητα αλληλουχίας 69,57%. Η συγκεκριμένη λακκάση αποτελείται από 499 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 60 kDa και προβλεπόμενο ισοηλεκτρικό σημείο 4,6¹⁰⁷. Για το 2,6-DMP το βέλτιστο pH δράσης βρέθηκε ίσο με 3,6¹⁰⁷, ενώ ως προς τις κινητικές σταθερές, εκείνες υπολογίστηκαν, με βάση το ABTS και σε pH 5: $K_M=85 \mu\text{M}$ και $k_{cat}/K_M=45,2 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ ¹⁰⁸. Η πρόβλεψη της δομής της λακκάσης 509913 παρουσιάζεται στην Εικόνα 30.



Εικόνα 30. Προβλεπόμενη δομή της λακκάσης 509913 (α) και του ενεργού της κέντρου (β)

Από το μοντέλο που δημιουργήθηκε, φαίνεται πως ο T1 χαλκός που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου συντονίζεται από δύο ιστοδίνες και μία κυστεΐνη, οι οποίες σχηματίζουν ένα επίπεδο, ενώ στον κατακόρυφο άξονα από μία φαινυλαλανίνη, η οποία καθορίζει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ενζύμου.

4 Συζήτηση αποτελεσμάτων – Συμπεράσματα

4.1 Διερεύνηση ενζυμικού προφίλ Βασιδιομυκήτων

Η μελέτη του ενζυμικού δυναμικού των στελεχών *P. citrinopileatus*, *A. biennis* και *G. resinaceum* έδειξε τον ισχυρό οξειδοαναγωγικό χαρακτήρα του συστήματος αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρίνης. Το κυρίαρχο ένζυμο που ανιχνεύτηκε κατά τη μέτρηση των ενζυμικών ενεργοτήτων ήταν οι λακκάσες, ακολουθούμενες από τις ενδο-1,4-ξυλανάσες και τις κυτταρινάσες. Πέρα, όμως, από τα βασικά ένζυμα αποικοδόμησης, ανιχνεύτηκε ένα μεγάλο εύρος βοηθητικών ενζύμων, τα οποία καθιστούν ευκολότερη την πρόσβαση στους πολυσακχαρίτες της βιομάζας.

Από τα αποτελέσματα των υδρολύσεων των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων που μελετήθηκαν προέκυψε μεγαλύτερη απελευθέρωση σακχάρων κατά την υδρόλυση του προκατεργασμένου ξύλου οξιάς συγκριτικά με τα προκατεργασμένα στελέχη αραβοσίτου. Το γεγονός αυτό μπορεί να συνδεθεί με τη διαφορετική δομή των ημικυτταρινών των δύο υποστρωμάτων. Έτσι, η αραβινογλυκουρονοξυλάνη των στελεχών αραβοσίτου, λόγω της μεγαλύτερης πολυπλοκότητάς της, παρουσιάζει μεγαλύτερη αντίσταση στην αποικοδόμηση σε σύγκριση με τη γλυκουρονοξυλάνη του ξύλου οξιάς.

Συγκεκριμένα, για το *P. citrinopileatus*, τα ένζυμα που εκκρίνονται από τον μικροοργανισμό και που εντοπίζονται στην επιφάνεια επαφής του με το λιγνινοκυτταρινούχο υπόστρωμα, επιβεβαιώνονται από την πρωτεομική ανάλυση του διαλύματος απομόνωσης των προσκολλημένων στη βιομάζα ενζύμων. Χαρακτηριστικά, ανιχνεύτηκαν υδρολυτικά ένζυμα των οικογενειών GH5, 6 και 7, στις οποίες ανήκουν οι ενδο-1,4-ξυλανάσες και οι κυτταρινάσες, όπως επίσης και της οικογένειας GH3, η οποία περιλαμβάνει αραβινοφουρανοζιδάσες, γλυκοζιδάσες και ξυλοζιδάσες. Όσον αφορά τις εστεράσες, η οικογένεια CE15, η οποία περιλαμβάνει γλυκουρονικές εστεράσες, ανιχνεύτηκε, χωρίς, όμως, να ποσοτικοποιηθεί στο εξωκυτταρικό πρωτέωμα του μικροοργανισμού, ενώ η ανίχνευση των οικογενειών CE1 και CE4 επιβεβαιώνει την παραγωγή εστερασών του οξικού οξέος. Τέλος, ως προς τα οξειδοαναγωγικά ένζυμα, δεν ανιχνεύτηκε κανένα ένζυμο της οικογένειας AA1, παρά τη μέτρηση ενεργότητας λακκασών στο διάλυμα απομόνωσης ενζύμων, ενώ η ανίχνευση της οικογένειας AA9 υποδηλώνει την έκκριση μονοοξυγενασών των πολυσακχαριτών (LPMO), η οποία, μάλιστα, φαίνεται να επάγεται από το υπόστρωμα, καθώς δεν είναι ανιχνεύσιμες σε καλλιέργειες ξυλόζης. Επισημαίνεται πως η πρωτεομική ανάλυση αφορά τα ένζυμα που απομονώθηκαν από την επιφάνεια επαφής του μικροοργανισμού με τη βιομάζα. Συνεπώς, η μη ανίχνευση ορισμένων ενζύμων ή η υποέκφρασή τους στις καλλιέργειες αυτές δεν συνεπάγεται μη έκκρισή τους από τον μικροοργανισμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι λακκάσες (AA1), οι οποίες ενώ εντοπίστηκαν μέσω της ενεργότητάς τους στο εξωκυτταρικό εκχύλισμα του *P. citrinopileatus*, δεν ανιχνεύτηκαν μέσω πρωτεομικής ανάλυσης στο διάλυμα απομόνωσης του μικροοργανισμού. Αντιθέτως, αναμένεται η ανίχνευση ενζύμων που προσδένονται στη βιομάζα με τη βοήθεια ειδικών μονάδων πρόσδεσης στις υδατανθρακικές αλυσίδες (carbohydrate-binding modules, CBM),

όπως ορισμένες κυτταρινάσες, εστεράσες και μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών, η οποία επιβεβαιώνεται μέσω της πρωτεομικής ανάλυσης.

Όσον αφορά το *A. biennis*, η στρατηγική αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρίνης επιβεβαιώνεται από την πρωτεομική ανάλυση του εξωκυτταρικού του εκχυλίσματος. Στο εξωκυτταρικό πρωτέωμα του στελέχους ανιχνεύτηκαν ένζυμα της οικογένειας AA1, στην οποία ανήκουν οι λακκάσες, όσο και ένζυμα των οικογενειών GH5,6,7,10 και 43, οι οποίες περιλαμβάνουν ενδο-1,4-ξυλανάσες, κυτταρινάσες, ξυλοζιδάσες και γλυκοζιδάσες. Η ανίχνευση των οικογενειών GH3 και 43 πιθανώς να υποδηλώνει την ύπαρξη αραβινοφουρανοζιδασών στο εξωκυτταρικό υγρό του μικροοργανισμού, ωστόσο η ενεργότητα των συγκεκριμένων ενζύμων δεν ανιχνεύτηκε κατά τις δοκιμές ενεργότητας. Όσον αφορά τις εστεράσες, η ανίχνευση της οικογένειας CE16 επιβεβαιώνει την έκκριση εστερασών του οξικού οξέος, ενώ της CE15 φανερώνει παραγωγή γλυκουρονικών εστερασών, οι οποίες, ωστόσο, δεν ανιχνεύτηκαν μέσω της ενεργότητάς τους. Επιπλέον, η ανίχνευση της οικογένειας CE1 υποδηλώνει την έκφραση και άλλων εστερασών, στις οποίες ανήκουν και οι εστεράσες του φερουλικού οξέος. Τέλος, ως προς τα οξειδοαναγωγικά ένζυμα, πέρα από τις λακκάσες, επιβεβαιώνεται η παραγωγή οξειδασών των αρυλ-αλκοολών (AA3_2), ενώ η ανίχνευση της οικογένειας AA9 υποδηλώνει την έκκριση μονοοξυγενασών των πολυσακχαριτών (LPMO), η οποία, μάλιστα, φαίνεται να επάγεται από το υπόστρωμα.

Καθίσταται φανερό ότι τα τρία στελέχη Βασιδιομυκήτων που μελετήθηκαν αποτελούν ισχυρούς αποικοδομητές της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Το ενζυμικό δυναμικό τους διαθέτει κυρίως οξειδοαναγωγικό χαρακτήρα, αποικοδομώντας τόσο τη λιγνίνη, μέσω των λακκασών, όσο και την κυτταρίνη, μέσω των μονοοξυγενασών των πολυσακχαριτών, ενώ ευρεία είναι και η παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων, της βασικής πολυμερικής αλυσίδας, αλλά και των πλευρικών ομάδων.

4.2 Χαρακτηρισμός απομονωμένων λακκασών

Τα μοριακά βάρη των απομονωμένων λακκασών *AbiLac1* και *AbiLac2* ανήκουν στο τυπικό εύρος μοριακών βαρών για τις μυκητιακές λακκάσες (60-70 kDa)⁴, ενώ εντός των αναμενόμενων, από τη βιβλιογραφία, οριακών τιμών βρίσκονται και οι βέλτιστες συνθήκες δράσης των λακκασών. Συγκεκριμένα, οι τιμές αυτές βρίσκονται εντός του εύρους pH 3,5-6,2 για μετρήσεις με το ίδιο υπόστρωμα, καθώς και εντός του εύρους θερμοκρασιών 50-70°C, στο οποίο εμφανίζουν βέλτιστη δράση οι περισσότερες λακκάσες μυκητιακής προέλευσης⁴. Επιπλέον, το προφίλ συσχέτισης της ενεργότητας των λακκασών με το pH της αντίδρασης παρουσιάζει την αναμενόμενη καμπανοειδή μορφή⁴. Τα συγκεκριμένα μεγέθη αλλά και οι συνθήκες δράσης συναντώνται και σε άλλες λακκάσες του Βασιδιομύκητα *Abortiporus biennis*, όπως στην περίπτωση της λακκάσης που απομόνωσαν οι Yin et al. (66 kDa, pH 5, 40°C)¹⁰⁹, οι Sharma et al. (51 kDa, pH 3,5, 50°C)¹¹⁰ και οι Zhang et al. (56 kDa, pH 3-4, 60°C)⁴⁶. Ωστόσο ανάλογα χαρακτηριστικά συναντώνται και σε λακκάσες από άλλους μύκητες, όπως η λακκάση του *Agaricus sinodeliciosus* με μοριακό βάρος 65 kDa, βέλτιστο pH 5 και βέλτιστη

θερμοκρασία δράσης 50°C¹¹¹, καθώς και η λακκάση του *Hericium erinaceum* με μοριακό βάρος 63 kDa, βέλτιστο pH 5 και βέλτιστη θερμοκρασία δράσης 50°C¹¹².

Ως προς τα υποστρώματα που οξειδώνουν οι δύο λακκάσες, η *AbiLac1* και η *AbiLac2* μπορούν να οξειδώσουν ένα μεγάλο εύρος ενώσεων. Συγκεκριμένα, τα δύο ένζυμα παρουσίασαν μεγάλη καταλυτική δράση κατά την οξείδωση τόσο όρθο-υποκατεστημένων ενώσεων (γουαϊακόλη, καφεϊκό οξύ, κατεχόλη, γαλλικό οξύ, πυρογαλλόλη, πρωτοκατεχουϊκό οξύ) όσο και πάρα-υποκατεστημένων ενώσεων (υδροκινόνη, π-κρεσόλη), αλλά και ενώσεων με υποκατάσταση στη θέση μέτα-(ρεσορκινόλη). Συγκριτικά οι δύο λακκάσες φαίνεται να έχουν παρόμοιες προτιμήσεις ως προς τη δομή του υποστρώματος, με την *AbiLac2* να εμφανίζει, ωστόσο, μεγαλύτερη οξειδωτική δράση ως προς τη φαινόλη, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ και την ο-κρεσόλη. Βιβλιογραφικά, φαίνεται ότι διαφορετικές λακκάσες παρουσιάζουν αισθητές διαφορές ως προς την καταλυτική τους δράση ανάλογα με τη δομή του υποστρώματος. Για παράδειγμα, οι όρθο-υποκατεστημένες ενώσεις συνιστούν καλύτερα υποστρώματα για τη λακκάση του μύκητα *Polygorus brumalis* σε σχέση με τις παρα-υποκατεστημένες ενώσεις, ενώ μικρότεροι ρυθμοί σημειώθηκαν για ενώσεις με μέτα-υποκατάσταση⁵⁸. Η λακκάση του *Ganoderma lucidum*, από την άλλη, έδειξε οξειδωτική δράση μόνο απέναντι σε όρθο- και πάρα- υποκατεστημένες ενώσεις⁵⁹. Σημειώνεται πως για τις απομονωμένες λακκάσες, *AbiLac1* και *AbiLac2*, η πάρα-υποκατεστημένη κρεσόλη αποτελεί καλύτερο υπόστρωμα σε σύγκριση με τη μέτα-υποκατεστημένη κρεσόλη, ενώ η ο-κρεσόλη κατάφερε να οξειδωθεί σε πολύ μικρό βαθμό μόνο από την *AbiLac2*. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα έδειξαν πως και τα δύο ένζυμα εμφανίζουν προτίμηση ως προς τις υδροξυβενζόλες με έναν υποκαταστάτη υδροξυλίου στην όρθο- θέση, ακολουθούν οι υδροξυβενζόλες με δύο μεθοξυ-ομάδες σε όρθο- θέση, οι υδροξυβενζόλες με μία μεθοξυ-ομάδα σε όρθο- θέση, και τέλος οι υδροξυβενζόλες με δύο υποκαταστάτες υδροξυλίου σε όρθο- θέση. Ωστόσο, το ABTS αποτελεί το υπόστρωμα για το οποίο υπολογίστηκε η μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα, ενώ για όλα τα υποστρώματα παρατηρείται μεγαλύτερη καταλυτική δράση στην περίπτωση της *AbiLac1*.

Οι κινητικές σταθερές K_M και v_{max} για τις δύο λακκάσες, *AbiLac1* και *AbiLac2*, προσδιορίστηκαν για το ABTS και την κατεχόλη. Οι τιμές της σταθεράς K_M για το ABTS βρίσκονται εντός του τυπικού εύρους 4-770 μM για τις μυκητιακές λακκάσες, ενώ προσεγγίζουν και τη συνηθέστερη τιμή που παρατηρείται, η οποία αντιστοιχεί στα 40 μM ⁴. Αντίστοιχα δεδομένα έχουν ληφθεί για τις λακκάσες των μυκήτων *Panaeolus sphinctrinus*, *Panaeolus papilionaceus*, *Coprinus friesii* και *Polygorus pinsitus* με K_M ως προς το ABTS 32, 51, 41 και 22 μM ¹¹³, αντίστοιχα, ενώ για λακκάση του *Abortiporus biennis* προσδιορίστηκε η τιμή της K_M 34 μM ⁴⁶.

Ως προς τη θερμοκρασιακή σταθερότητα, οι δύο λακκάσες φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σταθερές, κυρίως σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Σημειώνεται πως η θερμοκρασιακή σταθερότητα των λακκασών ποικίλει σε μεγάλο βαθμό ανάμεσα σε λακκάσες διαφορετικής προέλευσης. Για παράδειγμα, άλλη λακκάση του ίδιου Βασιδιομύκητα διατηρεί το 85 και 73% της ενεργότητάς της ύστερα από επώαση 6 h στους 50 και 60°C, αντίστοιχα¹⁰⁹. Λακκάσες των μυκήτων *P. sphinctrinus*, *P.*

parilonacaeus, *C. friesii* εμφανίζουν 100% απώλεια της ενεργότητάς τους ύστερα από 1 h στους 60°C, ενώ στις ίδιες συνθήκες η λακκάση του *P. pinsitus* διατηρεί το 27% της ενεργότητάς της¹¹³. Τέλος, λακκάση του *Ganoderma lucidum* απενεργοποιείται απευθείας κατά την επώασή της στους 60°C⁵⁹.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ομοιότητα που εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά των *AbiLac1* και *AbiLac2* με εκείνα που προβλέπονται βιοπληροφορικά για τις δύο κύριες λακκάσες που ανιχνεύτηκαν στο εξωκυτταρικό πρωτέωμα του *A. biennis*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν ένζυμα της οικογένειας AA1 με μικρότερα, όμως, προβλεπόμενα μοριακά βάρη από τις απομονωμένες λακκάσες. Ωστόσο, η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στη γλυκοζυλίωση, καθώς και για τα δύο ένζυμα βρέθηκαν πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης. Επιπλέον, οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των δύο λακκασών εμφανίζουν υψηλά ποσοστά ομοιότητας με άλλες λακκάσες Βασιδιομυκήτων, με κυριότερες εκείνες των *P. ostreatus*^{102,103} και *A. faginea*¹⁰⁴, και *P. cinnabarinus*^{105,106} και *T. versicolor*^{107,108}, παρέχοντας, έτσι, πληροφορίες για την πιθανή δομή και τις καταλυτικές ιδιότητες των δύο λακκασών.

4.3 Αξιοποίηση των απομονωμένων λακκασών σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές

Μία από τις ιδιότητες των λακκασών, η οποία έχει κεντρίσει το ερευνητικό ενδιαφέρον στον τομέα της βιομηχανικής και περιβαλλοντικής μικροβιολογίας, αφορά στην ικανότητά τους να τροποποιούν ή ακόμη και να αποικοδομούν ένα μεγάλο εύρος ξενοβιοτικών ενώσεων και ανθεκτικών ρύπων. Στην κατηγορία αυτή των ενώσεων συμπεριλαμβάνονται υπολείμματα φαρμακευτικής προέλευσης, όπως είναι τα αντιβιοτικά, καθώς και φαινολικοί ρύποι, όπως είναι οι χλωροφαινόλες¹.

4.3.1 Βιομετατροπή τετρακυκλίνης

Τα αντιβιοτικά τετρακυκλίνης αποτελούν μία από τις κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται για κτηνιατρικούς σκοπούς, για την ανθρώπινη θεραπεία, αλλά και σε γεωργικές εφαρμογές. Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αντιβιοτικά, ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην τετρακυκλίνη, καθώς η χρήση της συνδέεται με σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένων οικολογικών κινδύνων και βλαβών για την ανθρώπινη υγεία. Μετά από τη φαρμακευτική αγωγή, περισσότερο από το 70% των αντιβιοτικών τετρακυκλίνης αποβάλλονται και απελευθερώνονται σε ενεργή μορφή στο περιβάλλον μέσω ούρων και περιττωμάτων από ανθρώπους και ζώα. Ο εξαιρετικά υδρόφιλος χαρακτήρας τους και η ισχυρή σταθερότητά τους έχουν ως αποτέλεσμα τη μακροχρόνια παραμονή και συσσώρευση στο υδάτινο περιβάλλον, εμποδίζοντας την ανάπτυξη ορισμένων χερσαίων και υδρόβιων ειδών. Επιπλέον, τα υπολείμματα αυτά των αντιβιοτικών προάγουν την ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία αυξάνοντας τον κίνδυνο ορισμένων λοιμώξεων⁹⁴. Ωστόσο, οι συμβατικές διεργασίες επεξεργασίας του νερού δεν είναι ικανές να απομακρύνουν αποτελεσματικά τα αντιβιοτικά τετρακυκλίνης, επομένως καθίσταται αναγκαία η εύρεση εναλλακτικών μεθόδων καθαρισμού⁹⁴. Τα τελευταία χρόνια έχουν διερευνηθεί μέθοδοι μετασχηματισμού καταλυόμενες από

ένζυμα για την απομάκρυνση αναδυόμενων οργανικών ρύπων, με τυπικά παραδείγματα ενζυμικής επεξεργασίας από υπεροξειδάσες του μαγγανίου και της λιγνίνης, ενώ έχει μελετηθεί και η αποικοδόμηση της τετρακυκλίνης από λακκάσες. Συγκεκριμένα, όμως, οι λακκάσες συνιστούν πιο ελκυστικά «εργαλεία» για την ενζυμική κατεργασία, καθώς, σε αντίθεση με τις υπεροξειδάσες, δεν απαιτούν υπεροξειδίο του υδρογόνου για να οξειδώσουν την οργανική ύλη, παρά μόνο μοριακό οξυγόνο, ενώ επιπλέον έχουν υψηλή βιομηχανική αξία λόγω του υψηλού ποσοστού μετατροπής που επιτυγχάνουν και της λειτουργικής τους σταθερότητας¹¹⁴. Έτσι, οι λακκάσες αποτελούν έναν εξαιρετικό υποψήφιο για την αποικοδόμηση των αντιβιοτικών τετρακυκλίνης.

Στην περίπτωση των απομονωμένων λακκασών, μόνο η *AbiLac1* κατάφερε να μειώσει τη συγκέντρωση της τετρακυκλίνης στον όγκο της αντίδρασης, ενώ η δράση της *AbiLac2* δεν οδήγησε σε μεταβολή της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού. Αντίστοιχες εφαρμογές βιομετατροπής έχουν περιγραφεί βιβλιογραφικά. Για παράδειγμα, μερικώς καθαρισμένη λακκάση (6 Units/mL) από τον μύκητα *Trametes versicolor* πέτυχε 16% μείωση στη συγκέντρωση της τετρακυκλίνης ύστερα από 4 h¹¹⁵. Η ίδια λακκάση σε συνδυασμό με τον διαμεσολαβητή 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο οδήγησε σε 100% αποικοδόμηση του αντιβιοτικού, ενώ εμπορική λακκάση του ίδιου μύκητα οδήγησε σε 78% μείωση της συγκέντρωσης της τετρακυκλίνης¹¹⁶. Ωστόσο σε διαφορετική μελέτη, ακινητοποιημένη εμπορική λακκάση του *T. versicolor* δεν κατάφερε να αποικοδομήσει την τετρακυκλίνη ύστερα από 24 h, ενώ σε συνδυασμό με τον διαμεσολαβητή συρινγκαλδεΐδη επέφερε 60% αποικοδόμηση σε του αντιβιοτικού, σε αντίστοιχες συνθήκες¹¹⁷. Ακινητοποιημένη λακκάση του μύκητα *Cerrena unicolor* (40 Units/mL) πέτυχε 100% αποσύνθεση της τετρακυκλίνης σε 48 h, ενώ η συγκέντρωση του αντιβιοτικού είχε ήδη μειωθεί κατά 80% στις πρώτες 8 h¹¹⁸. Επισημαίνεται, ωστόσο, πως τα βιβλιογραφικά αυτά δεδομένα δεν είναι πλήρως συγκρίσιμα με τα πειραματικά αποτελέσματα της εργασίας καθώς οι λακκάσες *AbiLac1* και *AbiLac2* χρησιμοποιήθηκαν σε ελεύθερη μορφή και σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

4.3.2 Βιομετατροπή χλωροφαινολών

Οι χλωροφαινόλες αποτελούν χλωριωμένες αρωματικές ενώσεις που εντοπίζονται, συνήθως, σε παρασκευάσματα φυτοφαρμάκων και βιομηχανικά απόβλητα. Είναι ανθεκτικές ως προς τη βιοαποικοδόμηση και, κατά συνέπεια, παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον. Λόγω της λιποφιλίας τους μπορούν να μεταφερθούν μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και να συσσωρευτούν εντός υδρόβιων οργανισμών. Θεωρούνται, επιπλέον, επιβλαβείς για την ανθρώπινη υγεία λόγω της καρκινογόνου και μεταλλαξιγόνου δράσης τους, αλλά και της τοξικότητάς τους⁹⁵. Η ευρεία εφαρμογή τους στη βιομηχανία συνεπάγεται την απόρριψη μεγάλων ποσοτήτων τους στα βιομηχανικά λύματα, συμβάλλοντας σε μεγάλο βαθμό στη ρύπανση του περιβάλλοντος. Επομένως, κρίνεται αναγκαία η εύρεση οικονομικών και οικολογικών μεθόδων αποικοδόμησης των χλωροφαινολών. Οι λακκάσες έχουν δείξει ότι μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλά ποσοστά αποικοδόμησης χλωροφαινολών, όπως η 2-χλωροφαινόλη, η 4-χλωροφαινόλη, η 2,4-

διχλωροφαινόλη, η 2,4,6-τριχλωροφαινόλη και η πενταχλωροφαινόλη. Η ικανότητα αυτή αποικοδόμησης εξαρτάται τόσο από την πηγή προέλευσης της λακκάσης, όσο και από τον αριθμό των ατόμων χλωρίου και τη θέση αυτών στον φαινολικό δακτύλιο

119

Στην περίπτωση των απομονωμένων λακκασών, με τη δράση της *AbiLac1* επιτεύχθηκε αποικοδόμηση και των τριών χλωροφαινολών, ενώ η *AbiLac2* φάνηκε να αποικοδομεί μόνο τη 2,4-διχλωροφαινόλη. Αντίστοιχες εφαρμογές έχουν περιγραφεί βιβλιογραφικά. Για παράδειγμα, λακκάση που απομονώθηκε από τον *T. versicolor* επέφερε 100% διάσπαση στη 2-χλωροφαινόλη, ύστερα από 24ωρη αντίδραση, ενώ εμπορική λακκάση του *Myceliophthora thermophila* οδήγησε σε 79 και 16% αποσύνθεση της 2-χλωροφαινόλης, παρουσία και απουσία διαμεσολαβητή, αντίστοιχα¹²⁰. Λακκάση του *Trametes villosa* (2 Units/mL) οδήγησε σε 45% αποικοδόμηση της 4-χλωροφαινόλης ύστερα από 24 h, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τη 2,4-διχλωροφαινόλη ισούταν με 100%¹²¹. Προτίμηση στις διχλωροφαινόλες σε σύγκριση με τις μονοφαινόλες έδειξε και η λακκάση του *Coriolus versicolor*. Συγκεκριμένα 0,06 mg/mL ενζύμου κατάφεραν να μειώσουν τη συγκέντρωση της 2-χλωροφαινόλης, της 4-χλωροφαινόλης και της 2,4-διχλωροφαινόλης κατά 15, 10 και 67%, αντίστοιχα, ύστερα από 4 h, ενώ 0,08 mg/mL οδήγησαν σε 80% αποικοδόμηση των μονοφαινολών και 94% αποσύνθεση της 2,4-διχλωροφαινόλης ύστερα από 24 h¹²². Σημειώνεται πως η συγκεκριμένη προτίμηση του υποστρώματος ως προς τον αριθμό των ατόμων χλωρίου επιβεβαιώνεται και από τα απομονωμένα ένζυμα *AbiLac1* και *AbiLac2*, τα οποία παρουσιάζουν αρκετά μεγαλύτερη ικανότητα οξειδωσης της 2,4-διχλωροφαινόλης σε σύγκριση με τις μονοφαινόλες.

4.4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε πλήρης ανάλυση του ενζυμικού συστήματος αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρίνης τριών στελεχών Βασιδιομυκήτων λευκής σήψης μέσω βιοχημικών μεθόδων, ενώ για δύο από αυτούς τους μύκητες τα αποτελέσματα ενισχύθηκαν από την πρωτεομική ανάλυση του εξωκυτταρικού τους εκχυλίσματος. Και τα τρία στελέχη διαθέτουν την ικανότητα αποικοδόμησης όλων των συστατικών της λιγνινοκυτταρίνης παράγοντας ένα μεγάλο εύρος υδρολυτικών και οξειδοαναγωγικών ενζύμων, με την στρατηγική αποικοδόμησής τους να στηρίζεται κυρίως σε οξειδωτικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα για το *Abortiporus biennis*, ένα στέλεχος το οποίο έχει μελετηθεί ελάχιστα στο παρελθόν, ενδιαφέρον παρουσιάζει το πλούσιο σε οξειδωτικά ένζυμα εξωκυτταρικό του πρωτέωμα, από το οποίο απομονώθηκαν δύο καινοτόμες λακκάσες. Τα καθαρά ένζυμα *AbiLac1* και *AbiLac2* διαθέτουν αξιοσημείωτες ικανότητες οξειδωσης φαινολικών αλλά και μη φαινολικών υποστρωμάτων, γεγονός σπάνιο απουσία διαμεσολαβητή^{87,123}, με αποτέλεσμα να μπορούν να θεωρηθούν πολύτιμα βιοτεχνολογικά εργαλεία. Ειδικότερα, η λακκάση *AbiLac1* διαθέτει σημαντικές προοπτικές αξιοποίησης σε περιβαλλοντικές εφαρμογές βιοεξυγίανσης, όπως έγινε φανερό από τις υψηλές αποδόσεις βιομετατροπής της τετρακυκλίνης και των χλωροφαινολών, ρύποι των οποίων η βιοσυσσώρευση αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τα σύγχρονα οικοσυστήματα^{94,95}. Επομένως, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καθιστούν

τους Βασιδιομύκητες λευκής σήψης πολύτιμα βιοτεχνολογικά εργαλεία, καθώς και πηγή για την απομόνωση καινοτόμων ενζύμων. Για τον σκοπό αυτό κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη των μικροοργανισμών αυτών.

4.5 Μελλοντικοί στόχοι

Τα ενζυμικά συστήματα αποικοδόμησης της λιγνινοκυτταρίνης των μυκήτων λευκής σήψης παρουσιάζουν μεγάλη προοπτική αξιοποίησης σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές και βιομηχανικές διεργασίες, αποτελώντας μία οικονομική και οικολογική εναλλακτική^{3,51}. Όπως αποδείχθηκε από την παρούσα μελέτη, οι μικροοργανισμοί αυτοί διαθέτουν ισχυρό ενζυμικό δυναμικό, πλούσιο σε υδρολυτικά και οξειδωτικά ένζυμα, από τα οποία απομονώθηκαν και μελετήθηκαν δύο λακκάσες με αξιοσημείωτες ικανότητες οξείδωσης. Περαιτέρω διερεύνηση του ενζυμικού αυτού συστήματος μπορεί να οδηγήσει στην πιο αποτελεσματική κατανόηση των μηχανισμών αποικοδόμησης, καθώς και στην ανακάλυψη ενζύμων με επιθυμητές βιοτεχνολογικά ιδιότητες. Όσον αφορά τις απομονωμένες λακκάσες *AbiLac1* και *AbiLac2*, η οξείδωση ανθεκτικών φαινολικών και μη φαινολικών υποστρωμάτων απουσία διαμεσολαβητή, συμπεριλαμβανομένων επίμονων ρύπων, όπως οι χλωροφαινόλες και η τετρακυκλίνη, καθιστά τα ένζυμα αυτά πολύτιμα βιοτεχνολογικά εργαλεία, ιδιαίτερα σε περιβαλλοντικές εφαρμογές. Σαφώς, ο προσδιορισμός του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, καθώς και η διερεύνηση της οξειδωτικής δράσης στη βιομετατροπή άλλων ρυπαντών, αλλά και πλαστικών, θα δώσει μία πληρέστερη εικόνα των καταλυτικών δυνατοτήτων των συγκεκριμένων λακκασών. Επιπλέον, αναμένεται η ταυτοποίηση των γονιδίων των καθαρών ενζύμων, η οποία θα επιτρέψει την πρόβλεψη τόσο της δομής των δύο λακκασών, όσο και λοιπών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, οδηγώντας στην αποτελεσματικότερη αξιοποίησή τους.

5 Βιβλιογραφία

- (1) Peralta, R. M.; da Silva, B. P.; Gomes Côrrea, R. C.; Kato, C. G.; Vicente Seixas, F. A.; Bracht, A. Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. In *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*; Academic Press, 2017; pp 119–149. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4>.
- (2) Rytioja, J.; Hildén, K.; Yuzon, J.; Hatakka, A.; de Vries, R. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2014**, *78* (4), 614–649. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-14>.
- (3) Maciel, M. J. M.; Castro e Silva, A.; Ribeiro, H. C. T. Industrial and Biotechnological Applications of Ligninolytic Enzymes of the Basidiomycota: A Review. *Electron. J. Biotechnol.* **2010**, *13* (6). <https://doi.org/10.2225/VOL13-ISSUE6-FULLTEXT-2>.
- (4) Baldrian, P. Fungal Laccases-Occurrence and Properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30* (2), 215–242. <https://doi.org/10.1111/J.1574-4976.2005.00010.X>.
- (5) Smith, M. D. An Abbreviated Historical and Structural Introduction to Lignocellulose. *ACS Symp. Ser.* **2019**, *1338*, 1–15. <https://doi.org/10.1021/BK-2019-1338.CH001>.
- (6) Bajpai, P. Structure of Lignocellulosic Biomass. In *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*; Springer, Singapore, 2016; pp 7–12. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6_2.
- (7) Iqbal, H. M. N.; Kyazze, G.; Keshavarz, T. Advances in the Valorization of Lignocellulosic Materials by Biotechnology: An Overview. *BioResources* **2013**, *8* (2), 3157–3176. <https://doi.org/10.15376/biores.8.2.3157-3176>.
- (8) Kim, M.; Day, D. F. Composition of Sugar Cane, Energy Cane, and Sweet Sorghum Suitable for Ethanol Production at Louisiana Sugar Mills. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38* (7), 803–807. <https://doi.org/10.1007/S10295-010-0812-8>.
- (9) Malherbe, S.; Cloete, T. E. Lignocellulose Biodegradation: Fundamentals and Applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2002**, *12* (2), 105–114. <https://doi.org/10.1023/A:1020858910646>.
- (10) Prasad, S.; Singh, A.; Joshi, H. C. Ethanol as an Alternative Fuel from Agricultural, Industrial and Urban Residues. *Resour. Conserv. Recycl.* **2007**, *50* (1), 1–39. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2006.05.007>.
- (11) Zhu, Y.; Lee, Y.; Elander, R. Optimization of Dilute-Acid Pretreatment of Corn Stover Using a High-Solids Percolation Reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, *121–124* (1–3), 1045–1054. <https://doi.org/10.1385/ABAB:124:1-3:1045>.
- (12) McKendry, P. Energy Production from Biomass (Part 1): Overview of Biomass. *Bioresour. Technol.* **2002**, *83* (1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00118-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00118-3).

- (13) Abbasi, T.; Abbasi, S. A. Biomass Energy and the Environmental Impacts Associated with Its Production and Utilization. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14* (3), 919–937. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2009.11.006>.
- (14) Howard, R. L.; Abotsi, E.; Van Rensburg, E. L. J.; Howard, S. Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. *African J. Biotechnol.* **2003**, *2* (12), 702–733. <https://doi.org/10.5897/ajb2003.000-1115>.
- (15) Χριστακόπουλος, Π.; Τόπακας, Ε. *Βιοτεχνολογική Παραγωγή Βιοκαυσίμων*; Εκδόσεις Κάλλιπος: Αθήνα, 2015.
- (16) Dumanli, A. Nanocellulose and Its Composites for Biomedical Applications. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24* (5), 512–528. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161014124008>.
- (17) Ekeberg, D.; Gretland, K. S.; Gustafsson, J.; Bråten, S. M.; Fredheim, G. E. Characterisation of Lignosulphonates and Kraft Lignin by Hydrophobic Interaction Chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *565* (1), 121–128. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2006.02.008>.
- (18) Lu, Y.; Lu, Y. C.; Hu, H. Q.; Xie, F. J.; Wei, X. Y.; Fan, X. Structural Characterization of Lignin and Its Degradation Products with Spectroscopic Methods. *J. Spectrosc.* **2017**, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/8951658>.
- (19) Anwar, Z.; Gulfraz, M.; Irshad, M. Agro-Industrial Lignocellulosic Biomass a Key to Unlock the Future Bio-Energy: A Brief Review. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **2014**, *7* (2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/J.JRRAS.2014.02.003>.
- (20) Irmak, S. Biomass as Raw Material for Production of High-Value Products. In *Biomass Volume Estimation and Valorization for Energy*; 2017. <https://doi.org/10.5772/65507>.
- (21) Ruan, Z.; Wang, X.; Liu, Y.; Liao, W. Corn. In *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*; Academic Press, 2019; pp 59–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814138-0.00003-4>.
- (22) Kim, S.; Dale, B. E. Global Potential Bioethanol Production from Wasted Crops and Crop Residues. *Biomass and Bioenergy* **2004**, *26* (4), 361–375. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2003.08.002>.
- (23) Buranov, A. U.; Mazza, G. Extraction and Purification of Ferulic Acid from Flax Shives, Wheat and Corn Bran by Alkaline Hydrolysis and Pressurised Solvents. *Food Chem.* **2009**, *115* (4), 1542–1548. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.01.059>.
- (24) Vazquez-Olivo, G.; López-Martínez, L. X.; Contreras-Angulo, L.; Heredia, J. B. Antioxidant Capacity of Lignin and Phenolic Compounds from Corn Stover. *Waste Biomass Valorization* **2017**, *10* (1), 95–102. <https://doi.org/10.1007/S12649-017-0028-5>.
- (25) Bowman, B.; Taylor, J.; Brownlee, A.; Lee, J.; Lu, S.; White, T. Molecular Evolution of the Fungi: Relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes, and Chytridiomycetes. *Mol. Biol. Evol.* **1992**, *9* (2), 285–296.

- <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A040720>.
- (26) Naranjo-Ortiz, M. A.; Gabaldón, T. Fungal Evolution: Diversity, Taxonomy and Phylogeny of the Fungi. *Biol. Rev.* **2019**, *94* (6), 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/BRV.12550>.
- (27) Blackwell, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? *Am. J. Bot.* **2011**, *98* (3), 426–438. <https://doi.org/10.3732/AJB.1000298>.
- (28) Adl, S. M.; Bass, D.; Lane, C. E.; Lukeš, J.; Schoch, C. L.; Smirnov, A.; Agatha, S.; Berney, C.; Brown, M. W.; Burki, F.; Cárdenas, P.; Čepička, I.; Chistyakova, L.; Campo, J. del; Dunthorn, M.; Edvardsen, B.; Eglit, Y.; Guillou, L.; Hampl, V.; Heiss, A. A.; Hoppenrath, M.; James, T. Y.; Karnkowska, A.; Karpov, S.; Kim, E.; Kolisko, M.; Kudryavtsev, A.; Lahr, D. J. G.; Lara, E.; Gall, L. Le; Lynn, D. H.; Mann, D. G.; Massana, R.; Mitchell, E. A. D.; Morrow, C.; Park, J. S.; Pawlowski, J. W.; Powell, M. J.; Richter, D. J.; Rueckert, S.; Shadwick, L.; Shimano, S.; Spiegel, F. W.; Torruella, G.; Youssef, N.; Zlatogursky, V.; Zhang, Q. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2019**, *66* (1), 4–119. <https://doi.org/10.1111/JEU.12691>.
- (29) Wainwright, M.; Wickramasinghe, N.; Narlikar, J.; Rajaratnam, P. Microorganisms Cultured from Stratospheric Air Samples Obtained at 41 Km. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *218* (1), 161–165. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2003.TB11513.X>.
- (30) Oren, A.; Gunde-Cimerman, N. Fungal Life in the Dead Sea. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **2012**, *53*, 115–132. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23342-5_6.
- (31) Freeman, K.; Martin, A.; Karki, D.; Lynch, R.; Mitter, M.; Meyer, A. Evidence That Chytrids Dominate Fungal Communities in High-Elevation Soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (43), 18315–18320. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0907303106>.
- (32) Gonçalves, V.; Cantrell, C.; Wedge, D.; Ferreira, M.; Soares, M.; Jacob, M. Fungi Associated with Rocks of the Atacama Desert: Taxonomy, Distribution, Diversity, Ecology and Bioprospection for Bioactive Compounds. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18* (1), 232–245. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13005>.
- (33) Lundell, T.; Mäkelä, M.; Hildén, K. Lignin-Modifying Enzymes in Filamentous Basidiomycetes—Ecological, Functional and Phylogenetic Review. *J. Basic Microbiol.* **2010**, *50* (1), 5–20. <https://doi.org/10.1002/JOBM.200900338>.
- (34) Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y. Biotechnological Applications and Potential of Wood-Degrading Mushrooms of the Genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58* (5), 582–594. <https://doi.org/10.1007/S00253-002-0930-Y>.
- (35) Weis, A. L.; Wasser, S. P. Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective. *Crit. Rev. Immunol.* **1999**, *19* (1), 32. <https://doi.org/10.1615/CRITREVIMMUNOL.V19.I1.30>.
- (36) Gunde-Cimerman, N.; Cimerman, A. *Pleurotus* Fruiting Bodies Contain the

- Inhibitor of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase-Lovastatin. *Exp. Mycol.* **1995**, *19* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1006/EMYC.1995.1001>.
- (37) Wang, H.; Gao, J.; Ng, T. B. A New Lectin with Highly Potent Antihepatoma and Antisarcoma Activities from the Oyster Mushroom *Pleurotus Ostreatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *275* (3), 810–816. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2000.3373>.
- (38) DIPPLE, A. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis. **1985**, 1–17. <https://doi.org/10.1021/BK-1985-0283.CH001>.
- (39) Márquez-Rocha, F. J.; Hernández-Rodríguez, V. Z.; Vázquez-Duhalt, R. Biodegradation of Soil-Adsorbed Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the White Rot Fungus *Pleurotus Ostreatus*. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22* (6), 469–472. <https://doi.org/10.1023/A:1005663419547>.
- (40) Bezalel, L.; Hadar, Y.; Cerniglia, C. E. Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the White Rot Fungus *Pleurotus Ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62* (1), 292–295. <https://doi.org/10.1128/AEM.62.1.292-295.1996>.
- (41) Schwarze, F. W. M. R.; Ferner, D. GANODERMA ON TREES—DIFFERENTIATION OF SPECIES AND STUDIES OF INVASIVENESS. *Arboric. J.* **2003**, *27* (1), 59–77. <https://doi.org/10.1080/03071375.2003.9747362>.
- (42) Zhou, X.; Cong, W.; Su, K.; Zhang, Y. Ligninolytic Enzymes from *Ganoderma* Spp: Current Status and Potential Applications. *Crit. Rev. Microbiol.* **2013**, *39* (4), 416–426. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.722606>.
- (43) Liu, G. T. Recent Advances in Research of Pharmacology and Clinical Applications of *Ganoderma* P.Karst. Species (Aphyllphoromycetidae) in China. *Int. J. Med. Mushrooms* **1999**, *1* (1), 63–67. <https://doi.org/10.1615/INTJMEDMUSHROOMS.V1.I1.40>.
- (44) Cui, X.; Zhang, Y. Neuropharmacological Effect and Clinical Applications of *Ganoderma* (Lingzhi). *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1182*, 143–157. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9421-9_5.
- (45) Long, Z.; Liu, H.; Li, J.; Sun, J.; Xue, Y.; Hu, Z.; Su, Z.; Xu, C.; Yan, J. K. Preliminary Characterization of Exopolysaccharides Produced by *Abortiporus Biennis* in Submerged Fermentation. *Sains Malaysiana* **2019**, *48* (12), 2633–2640. <https://doi.org/10.17576/JSM-2019-4812-04>.
- (46) Zhang, G. Q.; Tian, T.; Liu, Y. P.; Wang, H. X.; Chen, Q. J. A Laccase with Anti-Proliferative Activity against Tumor Cells from a White Root Fungus *Abortiporus Biennis*. *Process Biochem.* **2011**, *46* (12), 2336–2340. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2011.09.020>.
- (47) Graz, M.; Jarosz-Wilkotazka, A.; Pawlikowska-Pawlega, B. *Abortiporus Biennis* Tolerance to Insoluble Metal Oxides: Oxalate Secretion, Oxalate Oxidase Activity, and Mycelial Morphology. *Biometals* **2009**, *22* (3), 401–410. <https://doi.org/10.1007/S10534-008-9176-1>.

- (48) Hemsworth, G.; Johnston, E.; Davies, G.; Walton, P. Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Biomass Conversion. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33* (12), 747–761. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2015.09.006>.
- (49) Biely, P.; Singh, S.; Puchart, V. Towards Enzymatic Breakdown of Complex Plant Xylan Structures: State of the Art. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34* (7), 1260–1274. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.09.001>.
- (50) Malgas, S.; Mafa, M. S.; Mkabayi, L.; Pletschke, B. I. A Mini Review of Xylanolytic Enzymes with Regards to Their Synergistic Interactions during Hetero-Xylan Degradation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35* (12), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S11274-019-2765-Z>.
- (51) Beg, Q.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. Microbial Xylanases and Their Industrial Applications: A Review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56* (3), 326–338. <https://doi.org/10.1007/S002530100704>.
- (52) Sunna, A.; Antranikian, G. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1997**, *17* (1), 39–67. <https://doi.org/10.3109/07388559709146606>.
- (53) Rani, S.; Nand, K. Development of Cellulase-Free Xylanase-Producing Anaerobic Consortia for the Use of Lignocellulosic Wastes. *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *18* (1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(96\)00061-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(96)00061-0).
- (54) Lee, J. Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. *J. Biotechnol.* **1997**, *56* (1), 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00073-4).
- (55) Christopher, L. P.; Yao, B.; Ji, Y. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. *Front. Energy Res.* **2014**, *0* (MAR), 12. <https://doi.org/10.3389/FENRG.2014.00012>.
- (56) Call, H. P.; Mücke, I. History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator-Systems (Lignozym®-Process). *J. Biotechnol.* **1997**, *53* (2–3), 163–202. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01683-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01683-0).
- (57) Jeon, J. R.; Murugesan, K.; Kim, Y. M.; Kim, E. J.; Chang, Y. S. Synergistic Effect of Laccase Mediators on Pentachlorophenol Removal by *Ganoderma Lucidum* Laccase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81* (4), 783–790. <https://doi.org/10.1007/S00253-008-1753-2>.
- (58) Blaich, R.; Esser, K. Function of Enzymes in Wood Destroying Fungi II. Multiple Forms of Laccase in White Rot Fungi. *Arch. Microbiol.* **1975**, *103*, 271–277.
- (59) Kumari, H. L.; Sirsi, M. Purification and Properties of Laccase from *Ganoderma Lucidum*. *Arch. für Mikrobiol.* **1972**, *84* (4), 350–357. <https://doi.org/10.1007/BF00409083>.
- (60) SV, S.; OV, M.; OV, N.; ES, G.; TV, R.; VA, S.; DS, B.; IG, G.; AI, Y. Comparison of Physico-Chemical Characteristics of Four Laccases from Different Basidiomycetes. *Biochimie* **2004**, *86* (9–10), 693–703.

- <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2004.08.005>.
- (61) Ko, E.-M.; Leem, Y.-E.; Choi, H. Purification and Characterization of Laccase Isozymes from the White-Rot Basidiomycete *Ganoderma Lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57* (1), 98–102.
<https://doi.org/10.1007/S002530100727>.
- (62) Martínez, A. T. Molecular Biology and Structure-Function of Lignin-Degrading Heme Peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30* (4), 425–444.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00521-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00521-X).
- (63) Erden, E.; Ucar, M.; Gezer, T.; Pazarlioglu, N. Screening for Lignolytic Enzymes from Autochthonous Fungi and Applications for Decolorization of Remazole Marine Blue. *Braz. J. Microbiol.* **2009**, *40* (2), 346–353.
<https://doi.org/10.1590/S1517-838220090002000026>.
- (64) Asgher, M.; Muhammad, H.; Iqbal, N. CHARACTERIZATION OF A NOVEL MANGANESE PEROXIDASE PURIFIED FROM SOLID STATE CULTURE OF *Trametes Versicolor* IBL-04.
- (65) Hofrichter, M.; Scheibner, K.; Bublitz, F.; Schneegaß, I.; Ziegenhagen, D.; Martens, R.; Fritsche, W. Depolymerization of Straw Lignin by Manganese Peroxidase from *Nematoloma Frowardii* Is Accompanied by Release of Carbon Dioxide. *Holzforschung* **1999**, *53* (2), 161–166.
<https://doi.org/10.1515/HF.1999.027>.
- (66) Martínez, Á. T.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Martínez, M. J.; del Río, J. C.; Gutiérrez, A. Enzymatic Delignification of Plant Cell Wall: From Nature to Mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20* (3), 348–357.
<https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2009.05.002>.
- (67) Agbor, V. B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A.; Levin, D. B. Biomass Pretreatment: Fundamentals toward Application. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29* (6), 675–685. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.05.005>.
- (68) Salvachúa, D.; Prieto, A.; López-Abelairas, M.; Lu-Chau, T.; Martínez, Á. T.; Martínez, M. J. Fungal Pretreatment: An Alternative in Second-Generation Ethanol from Wheat Straw. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102* (16), 7500–7506.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.05.027>.
- (69) Rico, A.; Rencoret, J.; Del Río, J.; Martínez, A.; Gutiérrez, A. Pretreatment with Laccase and a Phenolic Mediator Degrades Lignin and Enhances Saccharification of Eucalyptus Feedstock. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7* (1).
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-6>.
- (70) Martínez, Á. T.; Speranza, M.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Ferreira, P. Biodegradation of Lignocellulosics: Microbial, Chemical, and Enzymatic Aspects of the Fungal Attack of Lignin. *Int. Microbiol.* **2005**.
- (71) Ximenes, E.; Kim, Y.; Mosier, N.; Dien, B.; Ladisch, M. Inhibition of Cellulases by Phenols. *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46* (3–4), 170–176.
<https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2009.11.001>.

- (72) Anastasi, A.; Coppola, T.; Prigione, V.; Varese, G. C. Pyrene Degradation and Detoxification in Soil by a Consortium of Basidiomycetes Isolated from Compost: Role of Laccases and Peroxidases. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *165* (1–3), 1229–1233. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2008.10.032>.
- (73) Wen, X.; Jia, Y.; Li, J. Degradation of Tetracycline and Oxytetracycline by Crude Lignin Peroxidase Prepared from *Phanerochaete Chrysosporium* – A White Rot Fungus. *Chemosphere* **2009**, *75* (8), 1003–1007. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2009.01.052>.
- (74) Gomes, E.; Aguiar, A. P.; Carvalho, C. C.; Bonfá, M. R. B.; Da Silva, R.; Boscolo, M. Ligninases Production by Basidiomycetes Strains on Lignocellulosic Agricultural Residues and Their Application in the Decolorization of Synthetic Dyes. *Brazilian J. Microbiol.* **2009**, *40* (1), 31–39. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100005>.
- (75) Minussi, R. C.; Miranda, M. A.; Silva, J. A.; Ferreira, C. V.; Aoyama, H.; Marangoni, S.; Rotilio, D.; Pastore, G. M.; Durán, N. Purification, Characterization and Application of Laccase from *Trametes Versicolor* for Colour and Phenolic Removal of Olive Mill Wastewater in the Presence of 1-Hydroxybenzotriazole. *African J. Biotechnol.* **2007**, *6* (10), 1248–1254. <https://doi.org/10.4314/AJB.V6I10.57427>.
- (76) Selinheimo, E.; Kruus, K.; Buchert, J.; Hopia, A.; Autio, K. Effects of Laccase, Xylanase and Their Combination on the Rheological Properties of Wheat Doughs. *J. Cereal Sci.* **2006**, *43* (2), 152–159. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2005.08.007>.
- (77) dos Santos Barbosa, E.; Perrone, D.; do Amaral Vendramini, A. L.; Ferreira Leite, S. G. Vanillin Production by *Phanerochaete Chrysosporium* Grown on Green Coconut Agroindustrial Husk in Solid State Fermentation. *BioResources* **2008**, *3* (4), 1042–1050. <https://doi.org/10.15376/BIORES.3.4.1042-1050>.
- (78) Jegannathan, K. R.; Nielsen, P. H. Environmental Assessment of Enzyme Use in Industrial Production – a Literature Review. *J. Clean. Prod.* **2013**, *42*, 228–240. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2012.11.005>.
- (79) Virk, A. P.; Sharma, P.; Capalash, N. Use of Laccase in Pulp and Paper Industry. *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28* (1), 21–32. <https://doi.org/10.1002/BTPR.727>.
- (80) Woolridge, E. M. Mixed Enzyme Systems for Delignification of Lignocellulosic Biomass. *Catal. 2014, Vol. 4, Pages 1-35* **2014**, *4* (1), 1–35. <https://doi.org/10.3390/CATAL4010001>.
- (81) Bajpai, P.; Anand, A.; Bajpai, P. K. Bleaching with Lignin-Oxidizing Enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2006**, *12*, 349–378. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(06\)12010-4](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(06)12010-4).
- (82) Kunamneni, A.; Ghazi, I.; Camarero, S.; Ballesteros, A.; Plou, F. J.; Alcalde, M. Decolorization of Synthetic Dyes by Laccase Immobilized on Epoxy-Activated Carriers. *Process Biochem.* **2008**, *43* (2), 169–178. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2007.11.009>.

- (83) Robinson, T.; McMullan, G.; Marchant, R.; Nigam, P. Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative. *Bioresour. Technol.* **2001**, *77* (3), 247–255. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00080-8).
- (84) Neifar, M.; Jaouani, A.; Kamoun, A.; Ellouze-Ghorbel, R.; Ellouze-Chaabouni, S. Decolorization of Solophenyl Red 3BL Polyazo Dye by Laccase-Mediator System: Optimization through Response Surface Methodology. *Enzyme Res.* **2011**, *2011* (1). <https://doi.org/10.4061/2011/179050>.
- (85) Zilly, A.; Souza, C. G. M.; Barbosa-Tessmann, I. P.; Peralta, R. M. Decolorization of Industrial Dyes by a Brazilian Strain Of *Pleurotus Pulmonarius* Producing Laccase as the Sole Phenol-Oxidizing Enzyme. *Folia Microbiol.* **2002**, *47* (3), 273–277. <https://doi.org/10.1007/BF02817651>.
- (86) Shin, K.-S. The Role of Enzymes Produced by White-Rot Fungus *Irpex Lacteus* in the Decolorization of the Textile Industry Effluent. *J. Microbiol.* **2004**, *42* (1), 37–41.
- (87) Baiocco, P.; Barreca, A. M.; Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. Promoting Laccase Activity towards Non-Phenolic Substrates: A Mechanistic Investigation with Some Laccase-Mediator Systems. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (1), 191–197. <https://doi.org/10.1039/B208951C>.
- (88) Barilli, A.; Belinghieri, F.; Passarella, D.; Lesma, G.; Riva, S.; Silvani, A.; Danieli, B. Enzyme Assisted Enantioselective Synthesis of the Alkaloid (+)-Aloperine. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15* (18), 2921–2925. <https://doi.org/10.1016/J.TETASY.2004.06.056>.
- (89) Szamocki, R.; Flexer, V.; Levin, L.; Forchiasin, F.; Calvo, E. J. Oxygen Cathode Based on a Layer-by-Layer Self-Assembled Laccase and Osmium Redox Mediator. *Electrochim. Acta* **2009**, *54* (7), 1970–1977. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2008.09.002>.
- (90) Kuznetsov, B. A.; Shumakovich, G. P.; Koroleva, O. V.; Yaropolov, A. I. On Applicability of Laccase as Label in the Mediated and Mediatorless Electroimmunoassay: Effect of Distance on the Direct Electron Transfer between Laccase and Electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16* (1–2), 73–84. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00135-4).
- (91) Christenson, A.; Dimcheva, N.; Ferapontova, E. E.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Stoica, L.; Shleev, S.; Yaropolov, A. I.; Haltrich, D.; Thorneley, R. N. F.; Aust, S. D. Direct Electron Transfer Between Ligninolytic Redox Enzymes and Electrodes. *Electroanalysis* **2004**, *16* (13–14), 1074–1092. <https://doi.org/10.1002/ELAN.200403004>.
- (92) Ferapontova, E. E.; Shleev, S.; Ruzgas, T.; Stoica, L.; Christenson, A.; Tkac, J.; Yaropolov, A. I.; Gorton, L. Direct Electrochemistry of Proteins and Enzymes. *Perspect. Bioanal.* **2005**, *1* (C), 517–598. [https://doi.org/10.1016/S1871-0069\(05\)01016-5](https://doi.org/10.1016/S1871-0069(05)01016-5).
- (93) Bird, I. M. High Performance Liquid Chromatography: Principles and Clinical

- Applications. *BMJ Br. Med. J.* **1989**, 299 (6702), 783.
<https://doi.org/10.1136/BMJ.299.6702.783>.
- (94) Daghrrir, R.; Drogui, P. Tetracycline Antibiotics in the Environment: A Review. *Environ. Chem. Lett.* 2013 113 **2013**, 11 (3), 209–227.
<https://doi.org/10.1007/S10311-013-0404-8>.
- (95) Olaniran, A.; Igbinsosa, E. Chlorophenols and Other Related Derivatives of Environmental Concern: Properties, Distribution and Microbial Degradation Processes. *Chemosphere* **2011**, 83 (10), 1297–1306.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2011.04.009>.
- (96) Zhang, H.; Yohe, T.; Huang, L.; Entwistle, S.; Wu, P.; Yang, Z.; Busk, P. K.; Xu, Y.; Yin, Y. DbCAN2: A Meta Server for Automated Carbohydrate-Active Enzyme Annotation. *Nucleic Acids Res.* **2018**, 46 (W1), W95–W101.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKY418>.
- (97) Gupta, R.; Brunak, S. Prediction of Glycosylation across the Human Proteome and the Correlation to Protein Function.
- (98) Steentoft, C.; Vakhrushev, S. Y.; Joshi, H. J.; Kong, Y.; Vester-Christensen, M. B.; Schjoldager, K. T.-B. G.; Lavrsen, K.; Dabelsteen, S.; Pedersen, N. B.; Marcos-Silva, L.; Gupta, R.; Bennett, E. P.; Mandel, U.; Brunak, S.; Wandall, H. H.; Levery, S. B.; Clausen, H. Precision Mapping of the Human O-GalNAc Glycoproteome through SimpleCell Technology. *EMBO J.* **2013**, 32 (10), 1478–1488. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2013.79>.
- (99) Nielsen, H.; Tsigos, K. D.; Brunak, S.; von Heijne, G. A Brief History of Protein Sorting Prediction. *Protein J.* 2019 383 **2019**, 38 (3), 200–216.
<https://doi.org/10.1007/S10930-019-09838-3>.
- (100) Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc. Handb.* **2005**, 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>.
- (101) Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; De Beer, T. A. P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R.; Schwede, T. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, 46 (W1), W296–W303.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- (102) Palmeiri, G.; Giardina, P.; Marzullo, L.; Desiderio, B.; Nittii, G.; Cannio, R.; Sannia, G. Stability and Activity of a Phenol Oxidase from the Ligninolytic Fungus *Pleurotus Ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993 394 **1993**, 39 (4), 632–636. <https://doi.org/10.1007/BF00205066>.
- (103) Giardina, P.; Aurilia, V.; Cannio, R.; Marzullo, L.; Amoresano, A.; Siciliano, R.; Pucci, P.; Sannia, G. The Gene, Protein and Glycan Structures of Laccase from *Pleurotus Ostreatus*. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 235 (3), 508–515.
<https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1996.00508.X>.

- (104) Glazunova, O. A.; Polyakov, K. M.; Moiseenko, K. V.; Kurzeev, S. A.; Fedorova, T. V. Structure-Function Study of Two New Middle-Redox Potential Laccases from Basidiomycetes *Antrodiaella faginea* and *Steccherinum murashkinskyi*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *118*, 406–418. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.038>.
- (105) Eggert, C.; Temp, U.; Eriksson, K. E. The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62* (4), 1151.
- (106) Eggert, C.; LaFayette, P. R.; Temp, U.; Eriksson, K.-E. L.; Dean, J. F. D. Molecular Analysis of a Laccase Gene from the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64* (5), 1766.
- (107) Jolival, C.; Madzak, C.; Brault, A.; Caminade, E.; Malosse, C.; Mouglin, C. Expression of Laccase IIIb from the White-Rot Fungus *Trametes versicolor* in the Yeast *Yarrowia lipolytica* for Environmental Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *66* (4), 450–456. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1717-0>.
- (108) Bertrand, T.; Jolival, C.; Briozzo, P.; Caminade, E.; Joly, N.; Madzak, C. Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics^{†,‡}. *Biochemistry* **2002**, *41* (23), 7325–7333. <https://doi.org/10.1021/bi0201318>.
- (109) Yin, L.; Ye, J.; Kuang, S.; Guan, Y.; You, R. Induction, Purification, and Characterization of a Thermo and PH Stable Laccase from *Abortiporus biennis* J2 and Its Application on the Clarification of Litchi Juice. *OUP* **2017**, *81* (5), 1033–1040. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1279850>.
- (110) Sharma, M.; Jaiswal, D.; Yadav, S.; Yadava, S.; Yadav, K. D. PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF A YELLOW LACCASE FROM *ABORTIPORUS*. **2017**.
- (111) Hao, J.; Zhang, W.; Wang, H.; Ziya, N.; Luo, Y.; Jia, P.; Zhang, G.; Ng, T. Purification and Properties of a Laccase from the Mushroom *Agaricus sinodeliciosus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2021**, *68* (2), 297–306. <https://doi.org/10.1002/bab.1926>.
- (112) Wang, H. X.; Ng, T. B. A New Laccase from Dried Fruiting Bodies of the Monkey Head Mushroom *Herichium erinaceum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *322* (1), 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.075>.
- (113) Heinzkill, M.; Bech, L.; Halkier, T.; Schneider, P.; Anke, T. Characterization of Laccases and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family Coprinaceae). *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64* (5), 1601–1606. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.5.1601-1606.1998>.
- (114) Jeong, D.; Choi, K.-Y. Biodegradation of Tetracycline Antibiotic by Laccase Biocatalyst Immobilized on Chitosan-Tripolyphosphate Beads. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2020**, *56* (3), 306–312. <https://doi.org/10.1134/S0003683820030047>.

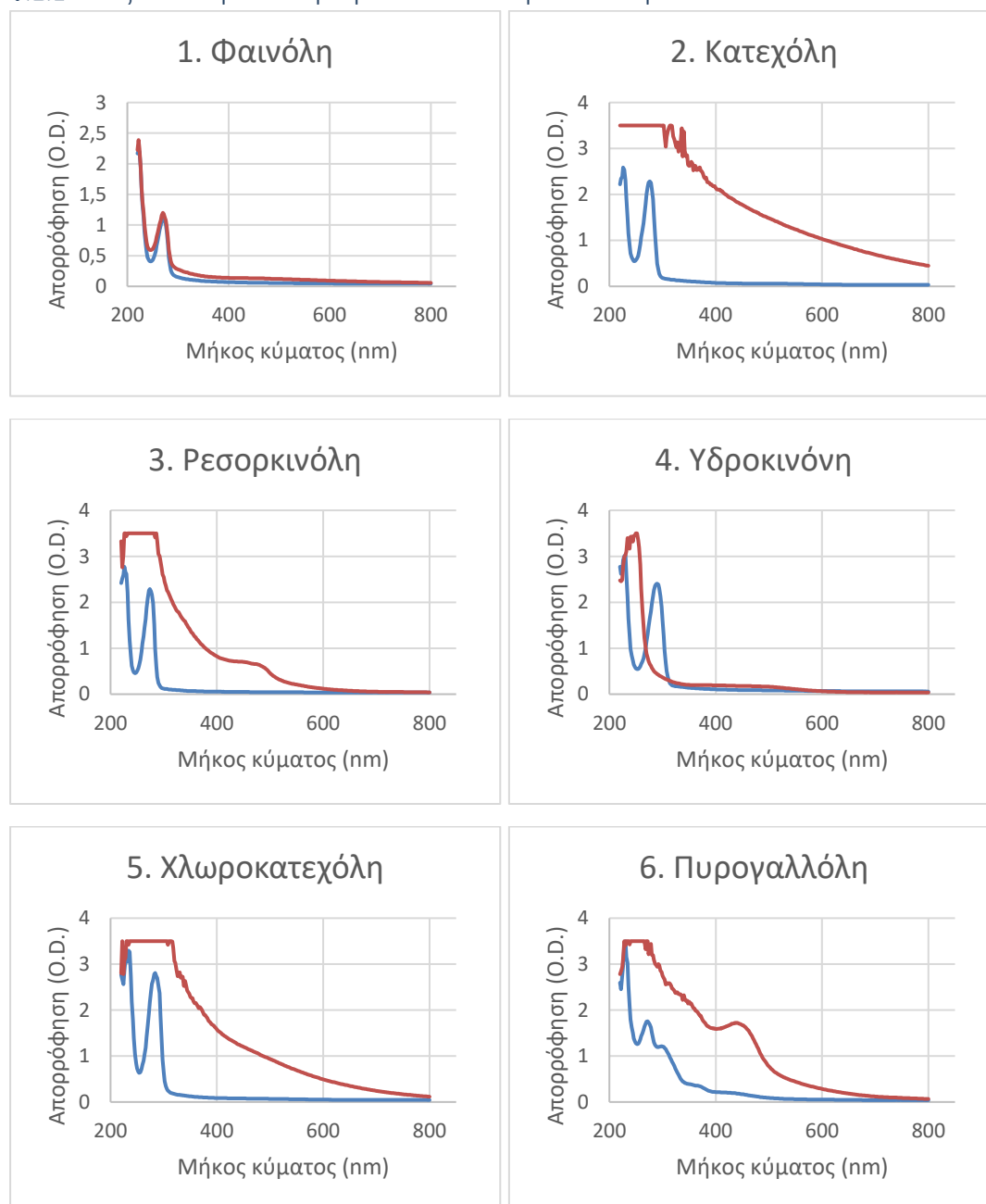
- (115) Suda, T.; Hata, T.; Kawai, S.; Okamura, H.; Nishida, T. Treatment of Tetracycline Antibiotics by Laccase in the Presence of 1-Hydroxybenzotriazole. *Bioresour. Technol.* **2012**, *103* (1), 498–501. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.10.041>.
- (116) Llorca, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Couillerot, O.; Panigoni, K.; de Gunzburg, J.; Bayer, S.; Czaja, R.; Barceló, D. Identification of New Transformation Products during Enzymatic Treatment of Tetracycline and Erythromycin Antibiotics at Laboratory Scale by an On-Line Turbulent Flow Liquid-Chromatography Coupled to a High Resolution Mass Spectrometer LTQ-Orbitrap. *Chemosphere* **2015**, *119*, 90–98. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.05.072>.
- (117) Becker, D.; Varela Della Giustina, S.; Rodriguez-Mozaz, S.; Schoevaart, R. Removal of Antibiotics in Wastewater by Enzymatic Treatment with Fungal Laccase - Degradation of Compounds Does Not Always Eliminate Toxicity. *Bioresour. Technol.* **2016**, *219*, 500–509. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.08.004>.
- (118) Yang, J.; Lin, Y.; Yang, X.; Ng, T. B.; Ye, X.; Lin, J. Degradation of Tetracycline by Immobilized Laccase and the Proposed Transformation Pathway. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *322*, 525–531. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.10.019>.
- (119) Liu, X.; Deng, W.; Yang, Y. Characterization of a Novel Laccase LAC-Yang1 from White-Rot Fungus *Pleurotus Ostreatus* Strain Yang1 with a Strong Ability to Degrade and Detoxify Chlorophenols. *Molecules* **2021**, *26* (2). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26020473>.
- (120) Haugland, J. O.; Kinney, K. A.; Johnson, W. H.; Camino, M. M. A.; Whitman, C. P.; Lawler, D. F. Laccase Removal of 2-Chlorophenol and Sulfamethoxazole in Municipal Wastewater. *Water Environ. Res.* **2019**. <https://doi.org/10.1002/WER.1006>.
- (121) Bollag, J.-M.; Chu, H.-L.; Rao, M. A.; Gianfreda, L. Enzymatic Oxidative Transformation of Chlorophenol Mixtures. *J. Environ. Qual.* **2003**, *32* (1), 63. <https://doi.org/10.2134/JEQ2003.0063>.
- (122) Zhang, J.; Liu, X.; Xu, Z.; Chen, H.; Yang, Y. Degradation of Chlorophenols Catalyzed by Laccase. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2008**, *61* (4), 351–356. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2007.06.015>.
- (123) Astolfi, P.; Brandi, P.; Galli, C.; Gentili, P. New Mediators for the Enzyme Laccase: Mechanistic Features and Selectivity in the Oxidation of Non-Phenolic Substrates. *New J. Chem.* **2005**. <https://doi.org/10.1039/B507657A>.

6 Παράρτημα

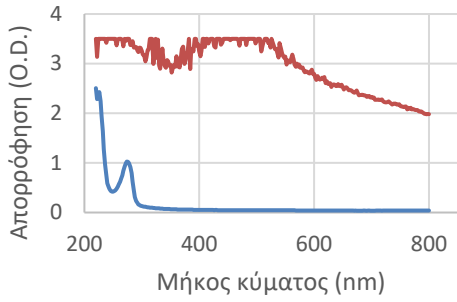
6.1 Παράρτημα A: Φάσματα UV-Vis από το πείραμα αξιολόγησης οξειδωσης υποστρωμάτων

Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης από τα 220 ως τα 800 nm, για την οξείδωση του κάθε υποστρώματος από καθένα από τα καθαρά ένζυμα, ύστερα από 24ωρη επώαση. Η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στα «τυφλά» διαλύματα, ενώ η κόκκινη στα δείγματα με το εκάστοτε ένζυμο.

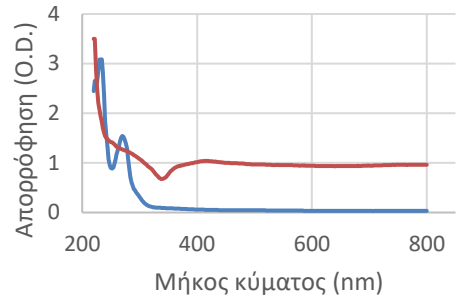
6.1.1 Οξείδωση υποστρωμάτων από τη λακκάση *AbiLac1*



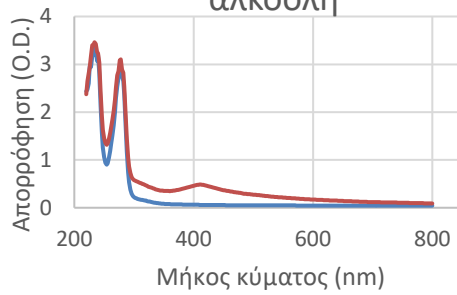
7. Γουαϊακόλη



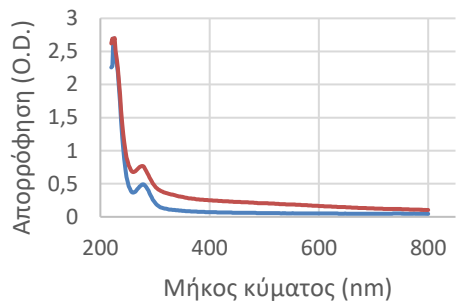
8. 2,6-Διμεθοξυφαινόλη



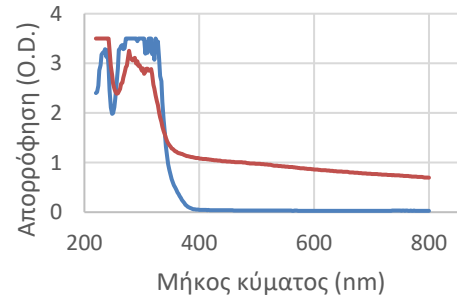
9. 3,4-Διμεθοξυβενζυλική
αλκοόλη



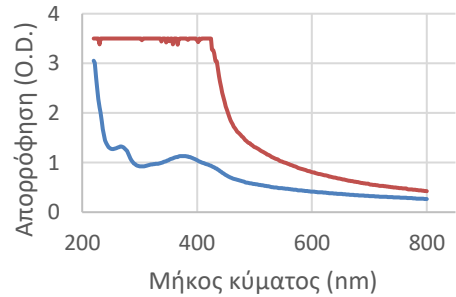
10. Ανιλίνη



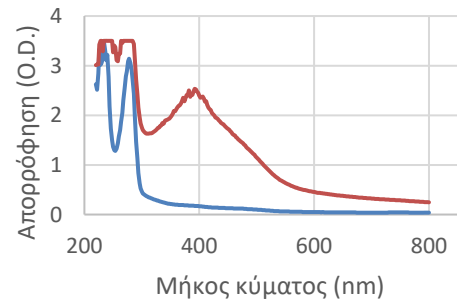
11. Βανιλίνη



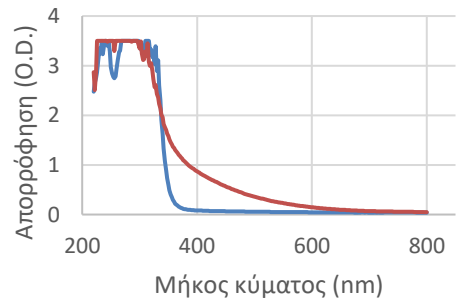
12. Κερσετίνη



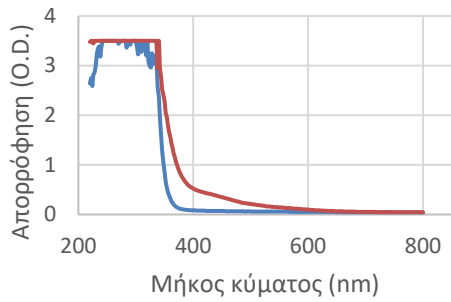
13. Κατεχίνη



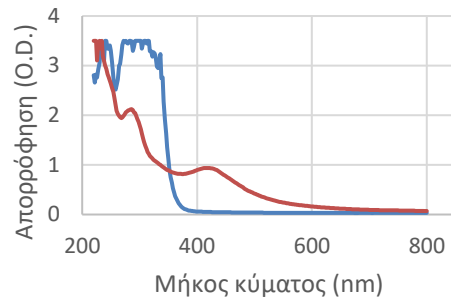
14. Καφεϊκό οξύ



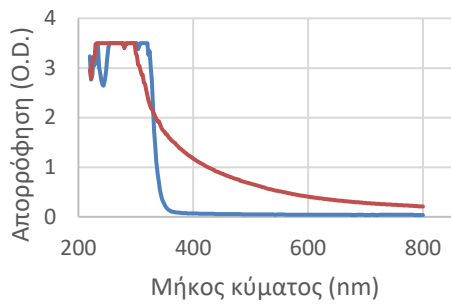
15. Φερουλικό οξύ



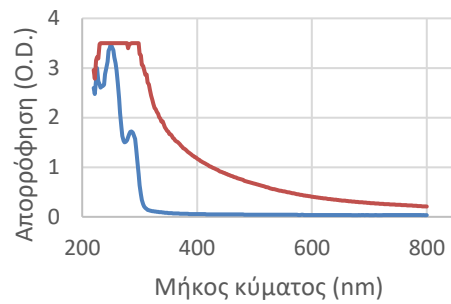
16. Σιναπικό οξύ



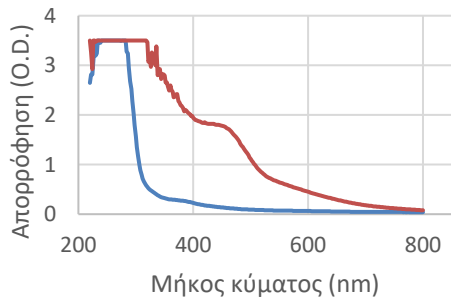
17. π-Κουμαρικό οξύ



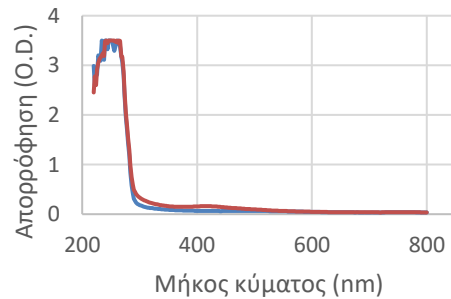
18. Βανιλλικό οξύ



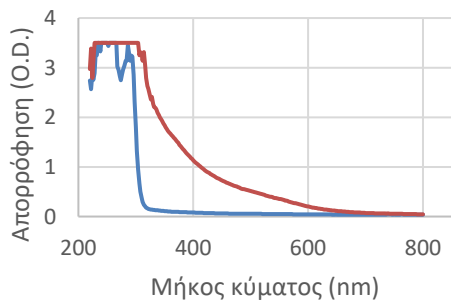
19. Γαλλικό οξύ



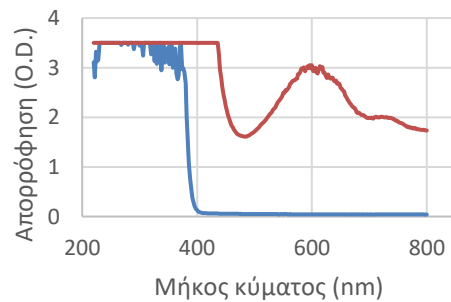
20. π-Υδροξυβενζοϊκό οξύ

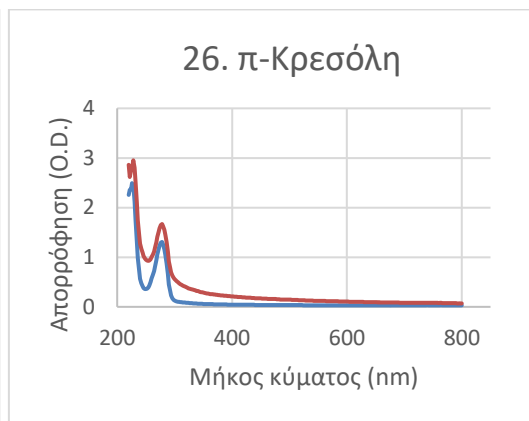
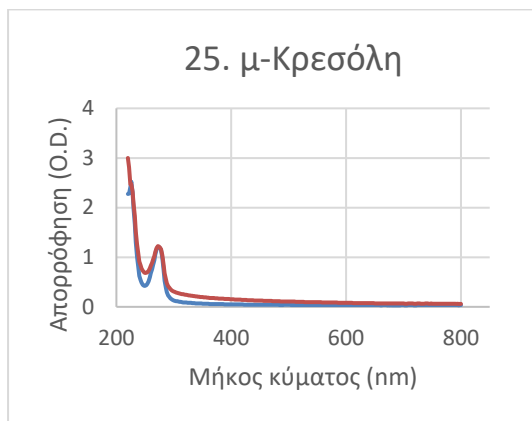
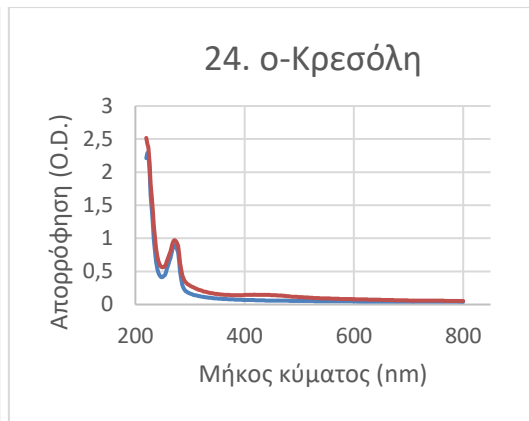
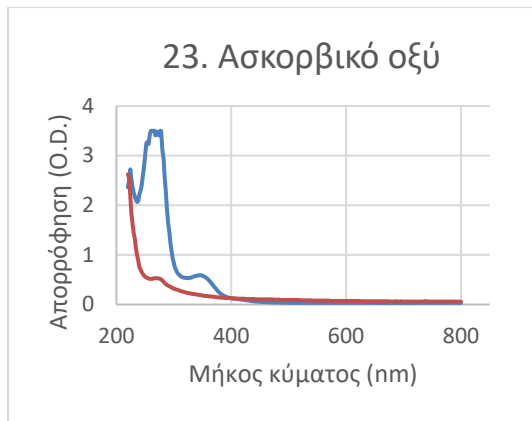


21. Πρωτοκατεχουϊκό οξύ

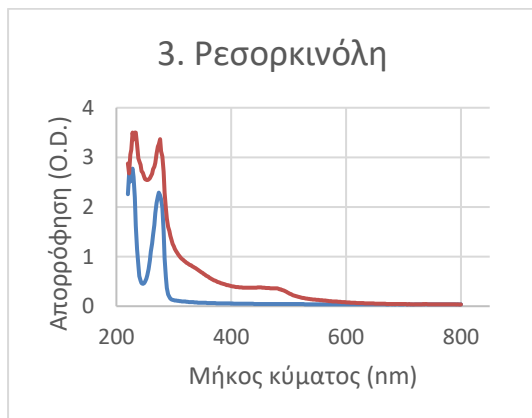
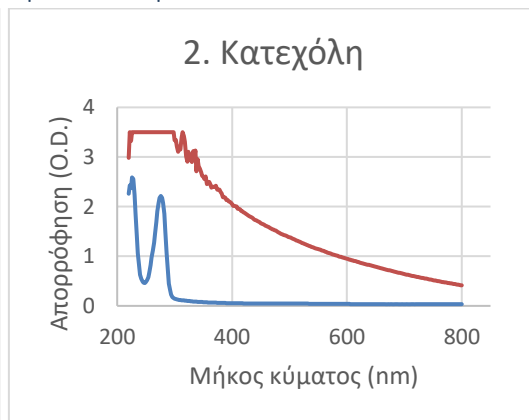
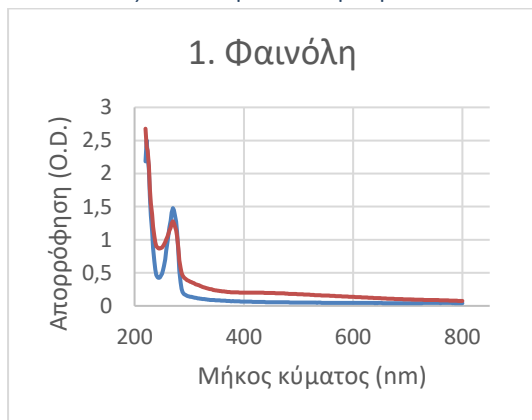


22. ABTS

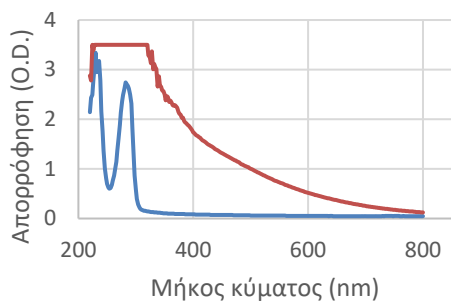




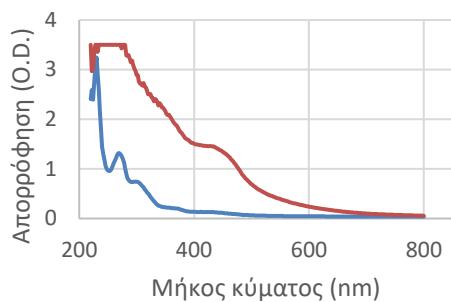
6.1.2 Οξείδωση υποστρωμάτων από τη λακκάση *AbiLac2*



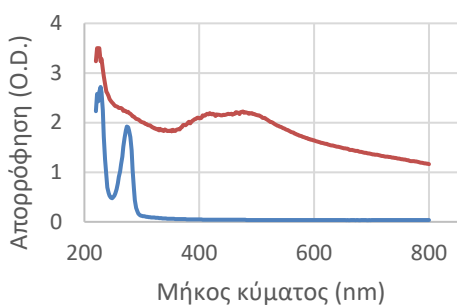
5. Χλωροκατεχόλη



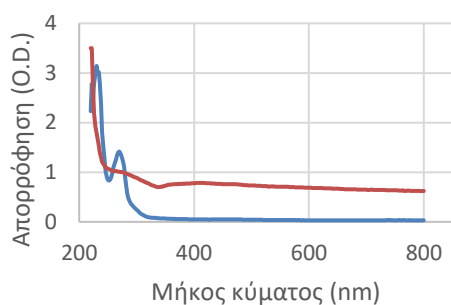
6. Πυρογαλλόλη



7. Γουαϊακόλη



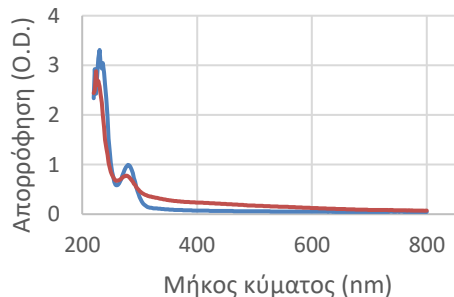
8. 2,6-Διμεθοξυφαινόλη



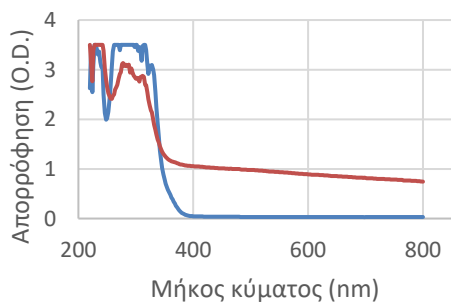
9. 3,4-Διμεθοξυβενζυλική αλκοόλη



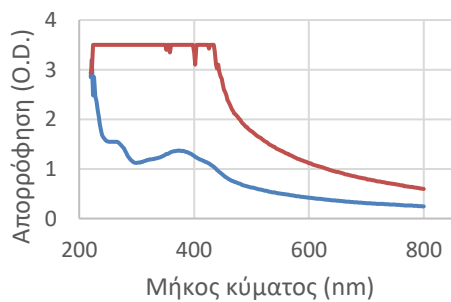
10. Ανιλίνη



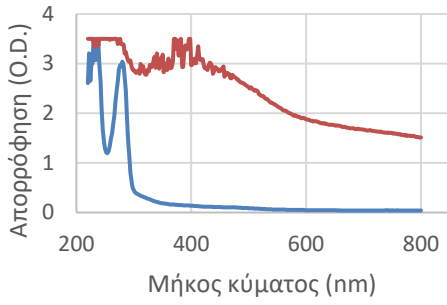
11. Βανιλίνη



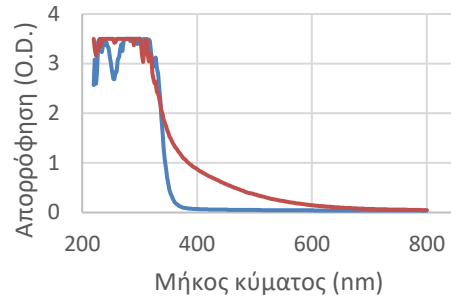
12. Κερσετίνη



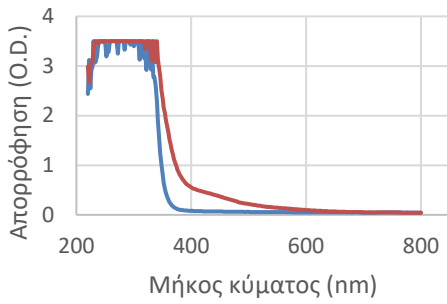
13. Κατεχίνη



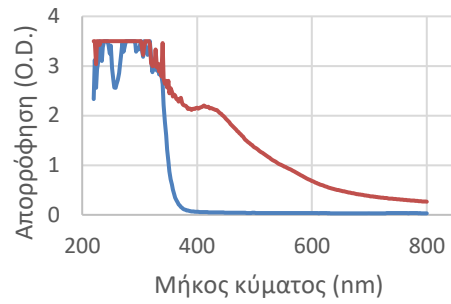
14. Καφεϊκό οξύ



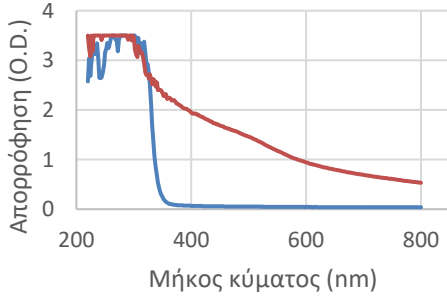
15. Φερουλικό οξύ



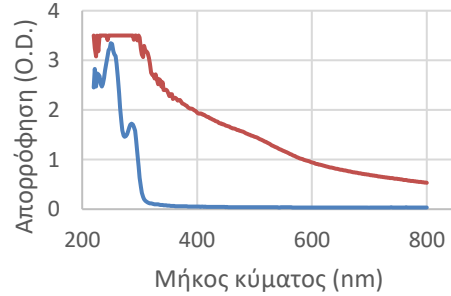
16. Σιναπικό οξύ



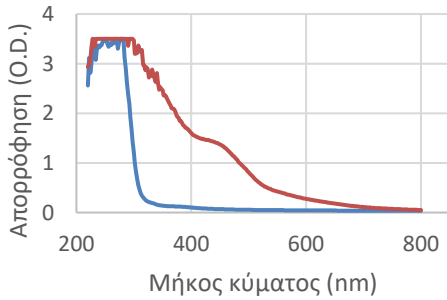
17. π-Κουμαρικό οξύ



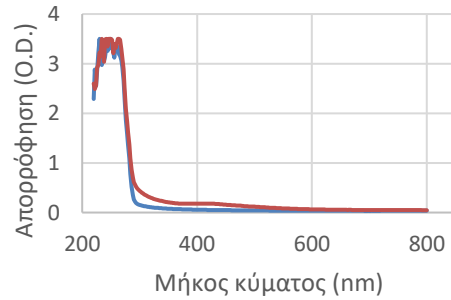
18. Βανιλλικό οξύ



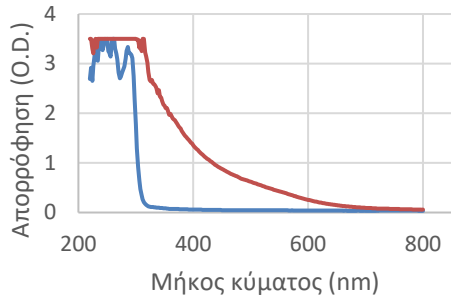
19. Γαλλικό οξύ



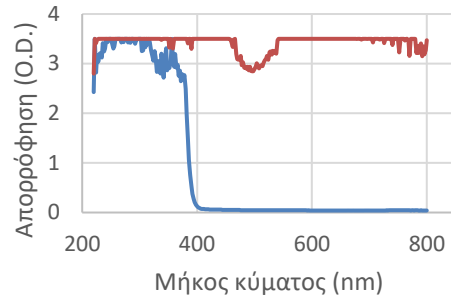
20. π-Υδροξυβενζοϊκό οξύ



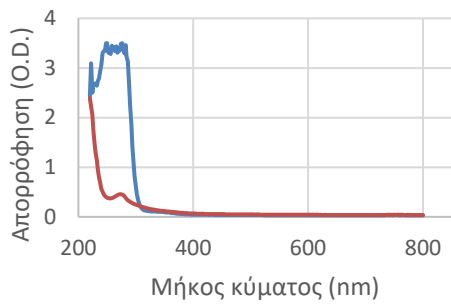
21. Πρωτοκατεχουϊκό οξύ



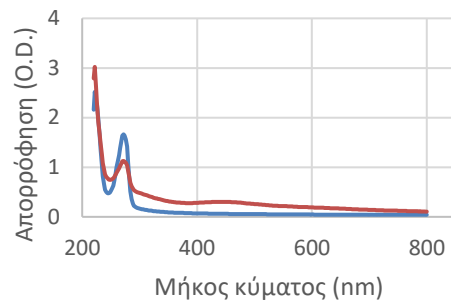
22. ABTS



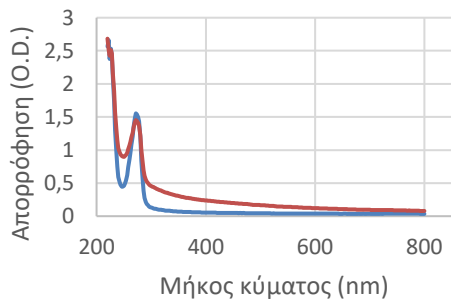
23. Ασκορβικό οξύ



24. ο-Κρεσόλη



25. μ-Κρεσόλη



26. π-Κρεσόλη

