

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΔΥΟ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΛΑΚΚΑΣΩΝ *PcLac1* ΚΑΙ *PcLac2* ΤΟΥ ΒΑΣΙΔΙΟΜΥΚΗΤΑ *Pleurotus citrinopileatus*

Χ. Πεντάρη¹, Α. Ζέρβα¹, Δ. Ζουράρης², Α. Καραντώνης², Ε. Τόπακας¹, *

¹ Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Αθηνών, Ηρώων Πολυτεχνείου 5, Ζωγράφου, Αθήνα 15780, Ελλάδα

² Εργαστήριο Φυσικοχημείας και Εφαρμοσμένης Ηλεκτροχημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Αθηνών, Ηρώων Πολυτεχνείου 5, Ζωγράφου, Αθήνα 15780, Ελλάδα

(*vtopakas@chemeng.ntua.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι λακκάσες ανήκουν στις πολυφαινολικές οξειδάσες, οι οποίες περιέχουν άτομα χαλκού στο ενεργό τους κέντρο και αποτελούν μία από τις κυριότερες κατηγορίες οξειδοαναγωγικών ενζύμων του λιγνινολυτικού συστήματος των Βασιδιομυκήτων. Ως βιοκαταλύτες χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως οξειδωτικό υπόστρωμα, ανάγοντάς το σε νερό, για να οξειδώσουν τέσσερα μόρια υποστρώματος, μέσω ενός μηχανισμού μεταφοράς τεσσάρων ηλεκτρονίων. Οι μυκητιακές λακκάσες συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της λιγνίνης αλλά και στη μορφογένεση του μικροοργανισμού. Ως προς τα αναγωγικά υποστρώματα τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν συνήθως μικρή εξειδίκευση, οξειδώνοντας πλήθος ενώσεων όπως πολυφαινόλες, μεθοξύ-υποκατεστημένες φαινόλες, αρωματικές διαμίνες και βενζενοθειόλες. Ως βιοκαταλύτες εμφανίζουν σημαντικές προοπτικές αξιοποίησης σε εφαρμογές βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος, όπως η κατεργασία λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, ο αποχρωματισμός βαφών, η βιολεύκανση χαρτοπολτού, η βιοαποικοδόμηση βιομηχανικών υγρών αποβλήτων ή και η σύνθεση καινοτόμων ενώσεων. Παράλληλα, η ανακάλυψη νέων λακκασών δίνει τη δυνατότητα σχεδιασμού νέων καινοτόμων βιοδιεργασιών. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε βιοχημικός χαρακτηρισμός δύο καινοτόμων εξωκυτταρικών λακκασών, των *PcLac1* και *PcLac2*, του Βασιδιομύκητα λευκής σήψης *Pleurotus citrinopileatus*. Ο καθαρισμός των λακκασών πραγματοποιήθηκε με στήλες ανιοντοανταλλαγής Q-sepharose και DEAE-sepharose. Παράλληλα εξετάστηκε, ως βιοτεχνολογική εφαρμογή, η αξιοποίηση των καθαρών ενζύμων σε αντιδράσεις σύνθεσης.

Οι λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2*, με μοριακά βάρη 60 και 80 kDa και φαινόμενα πρότυπα οξειδοαναγωγικά δυναμικά 250 και 200 mV αντίστοιχα, παρουσιάζουν χαρακτηριστικές απορροφήσεις γύρω στα 330 nm, με την *PcLac1* να έχει απορρόφηση και στα 610 nm, ενώ η *PcLac1* έχει ισηλεκτρικό σημείο pI 3,5. Οι βέλτιστες συνθήκες δράσης είναι σε pH 4,5 και 55°C για την *PcLac1* και σε pH 4 και 55°C για την *PcLac2*. Οι δύο λακκάσες οξειδώνουν κατά προτίμηση υδροβενζόλες και υδροξυκιναμικά οξέα, με την *PcLac1* να παρουσιάζει ενεργότητα 0,08 U/mg για την 2,6-DMP και την υδροκινόνη ενώ η *PcLac2* έχει 0,05 U/mg για την κατεχόλη και 0,09 U/mg για την υδροκινόνη. Οι σταθερές K_M και V_{max} είναι ίσες με 61 και 165 μM και 2,4 και 4,6 U/mg για τις *PcLac1* και *PcLac2* ως προς το ABTS, ενώ τα αντίστοιχα μεγέθη ως προς την 2,6-DMP είναι 672 και 1070 μM και 0,36 και 0,04 U/mg. Λειτουργική σταθερότητα παρατηρείται σε pH 5-9 για την *PcLac1* και σε pH 5-8 για την *PcLac2*. Η λακκάση *PcLac1* διατηρεί το 70% της ενεργότητάς της μετά από επώαση 2 h στους 50°C και 4 h στους 40°C, ενώ αντίστοιχα η *PcLac2* διατηρεί το 90% της ενεργότητάς της, μετά από 24 h στους 30°C, χωρίς να είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες. Παρουσία οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, DMSO, 1,4-διοξάνη), η *PcLac1* παρουσιάζει ισχυρή παρεμπόδιση ενώ η *PcLac2* είναι σταθερή σε διαλύματα 10% των διαλυτών. Οι λακκάσες παρεμποδίζονται έντονα παρουσία SDS 1 mM και NaN_3 0,01 mM, ενώ η *PcLac1* ενεργοποιείται σε Cu 0,25 mM και H_2O_2 1 mM. Τα ένζυμα παρουσιάζουν ακόμα δυνατότητα αξιοποίησης σε αντιδράσεις σύνθεσης με αποδόσεις (mg προϊόντος/mg υποστρώματος) 36% ως προς το σιναπικό και 6,8% ως προς το φερούλικό για την *PcLac1* αλλά και 81,5% ως προς το σιναπικό για την *PcLac2*, χωρίς ωστόσο να έχει ταυτοποιηθεί η σύνθεση των στερεών προϊόντων. Προς αυτήν την κατεύθυνση, η ανακάλυψη νέων οξειδωτικών βιοκαταλυτών και η εφαρμογή τους σε οργανικές συνθέσεις μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην παραγωγή καινοτόμων υλικών με αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές ή και φωτοπροστατευτικές ιδιότητες.