

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

Χ. Πεντάρη¹, Α. Ζέρβα¹, Δ. Ζουράρης², Α. Καραντώνης², Ε. Τόπακας^{1, *}

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

²Εργαστήριο 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 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 λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, η βιοαποικοδόμηση βιομηχανικών υγρών αποβλήτων ή και η σύνθεση καινοτόμων ενώσεων. Παράλληλα, η ανακάλυψη νέων λακκασών δίνει τη δυνατότητα σχεδιασμού νέων βιοδιεργασιών. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε βιοχημικός χαρακτηρισμός δύο καινοτόμων εξωκυτταρικών λακκασών, των *PcLac1* και *PcLac2*, του Βασιδιομύκητα λευκής σήψης *Pleurotus citrinopileatus*. 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, εμφανίζουν φαινόμενα πρότυπα οξειδοαναγωγικά δυναμικά 250 και 200 mV αντίστοιχα. Οι δύο λακκάσες οξειδώνουν κατά προτίμηση υδροβενζόλες και υδροξυκιναμικά οξέα ενώ οι σταθερές K_M και V_{max} είναι ίσες με 61 και 165 μM και 2,4 και 4,6 $U\ mg^{-1}$ 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 $U\ mg^{-1}$. Λειτουργική σταθερότητα των ενζύμων παρατηρείται σε θερμοκρασιακό εύρος 30 – 40 °C και σε pH 5-9 για την *PcLac1* και σε pH 5-8 για την *PcLac2*. Παρουσία οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, DMSO, 1,4-διοξάνη), η *PcLac1* παρουσιάζει ισχυρή παρεμπόδιση ενώ η *PcLac2* είναι σταθερή σε συγκεντρώσεις 10 % (v/v) 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 36 % (mg στερεού προϊόντος/mg υποστρώματος) ως προς το σιναπικό και 6,8 % ως προς το φερουλικό για την *PcLac1* αλλά και 81,5% ως προς το σιναπικό για την *PcLac2*, χωρίς ωστόσο να έχουν ταυτοποιηθεί τα στερεά προϊόντα. 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.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνολογική αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας αποτελεί αντικείμενο μελέτης με έντονο οικονομικό και οικολογικό ενδιαφέρον στον τομέα της Βιομηχανικής Βιοτεχνολογίας. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση ενζυμικών συστημάτων για τη βιομετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε βιοκαύσιμα ή άλλα προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας συγκεντρώνει ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Ωστόσο η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα παρουσιάζει δυσκολίες ως

προς την αξιοποίησή της σε βιομηχανικές διεργασίες, κυρίως λόγω της παρουσίας της λιγνίνης, η οποία συνδέεται με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη με ποικίλους δεσμούς. Λόγω του μεγάλου μεγέθους των μορίων της λιγνίνης και της ετερογενούς δομής της, η μικροβιακή της αποικοδόμηση πραγματοποιείται συνήθως εξωκυτταρικά ^[4,5,7,8]. Οι Βασιδιομύκητες λευκής σήψης παρουσιάζουν ένα πολύπλοκο ενζυμικό μηχανισμό, με συνεργιστική δράση, για την αποτελεσματική αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας. Συγκεκριμένα, οι λακκάσες έχουν τη δυνατότητα να καταλύσουν τη διάσπαση ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ ατόμων άνθρακα ή μεταξύ άνθρακα και οξυγόνου στα σύνθετα πολυμερή της λιγνίνης ^[9].

Οι λακκάσες (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) ανήκουν στην κατηγορία των πολυφαινολικών οξειδασών, οι οποίες περιέχουν άτομα χαλκού στο ενεργό τους κέντρο (multicopper oxidases). Ως οξειδωτικά ένζυμα παρουσιάζουν μικρή εξειδίκευση ως προς τα αναγωγικά υποστρώματα, και χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως οξειδωτικό υπόστρωμα, το οποίο ανάγεται σε νερό με ένα μηχανισμό μεταφοράς τεσσάρων ηλεκτρονίων. Οι περισσότερες λακκάσες που έχουν μελετηθεί είναι μυκητιακής προέλευσης, και κυρίως προέρχονται από τους μύκητες λευκής σήψης ^[7].

Η εξειδίκευση των λακκασών ως προς το υπόστρωμα εκτείνεται σε μεγάλο εύρος, το οποίο περιλαμβάνει ανιλίνες, βενζενοθειόλες, πολυφαινόλες, μεθοξύ- υποκατεστημένες φαινόλες, αρωματικές διαμίμες αλλά και άλλες ανόργανες, οργανικές ή βιολογικές ενώσεις, με χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (<1V), ^[6]. Το μέγεθος μιας τυπικής λακκάσης είναι περίπου 60-70 kDa και παρουσιάζει συνήθως όξινο ισοηλεκτρικό σημείο στο εύρος pH 2,6-6,9. Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των μυκητιακών λακκασών κυμαίνεται περίπου στα 0,4-0,8V ως προς ηλεκτρόδιο κανονικού υδρογόνου (normal hydrogen electrode [NHE]). Οι λακκάσες επιδεικνύουν υψηλή συγγένεια για υποστρώματα όπως το ABTS, τη συρινγκαλδαζίνη, το σιναπτικό οξύ, την υδροκινόνη ή το συρινγικό οξύ. Επιπλέον παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα σε αλκαλικά περιβάλλοντα, λόγω της παρεμπόδισης της αυτό-οξείδωσης από ανιόντα OH⁻. Η βέλτιστη θερμοκρασία εντοπίζεται μεταξύ 50-70 °C ενώ το βέλτιστο pH δράσης των λακκασών κυμαίνεται στην όξινη περιοχή, εξαρτώμενο ωστόσο από το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα ^[6].

Οι λακκάσες αποτελούν μία κατηγορία πολλά υποσχόμενων ενζύμων, ως προς τις βιοτεχνολογικές τους εφαρμογές. Για τη δράση τους χρησιμοποιούν ως συνυπόστρωμα το οξυγόνο, το οποίο υπάρχει φυσικά στο περιβάλλον τους. Οι βιομηχανικές εφαρμογές των λακκασών περιλαμβάνουν αποχρωματισμό βαφών σε βιομηχανίες βαφών ή υφασμάτων και κλωστοϋφαντουργίας, βιολεύκανση χαρτοπολτού, αποτοξικοποίηση ρύπων και βιοαποικοδόμηση βιομηχανικών υγρών αποβλήτων, οργανικές συνθέσεις, βιοαποκατάσταση του εδάφους από φυτοφάρμακα και εντομοκτόνα αλλά και αξιοποίηση σε ιατρικά διαγνωστικά εργαλεία και στην τεχνολογία τροφίμων ^[2,4,7].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι καθαρές λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2* απομονώθηκαν από υγρή καλλιέργεια του Βασιδιομύκητα *P. citrinopileatus*. Το στέλεχος διατηρούνταν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA στους 4 °C. Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και AppliChem (Γερμανία), και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού.

Ο καθαρισμός των απομονωμένων ενζύμων *PcLac1* και *PcLac2* πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματογραφικής στήλης ιοντοανταλλαγής Q Sepharose και DEAE –cellulose HiPrep DEAE FF 16/10 (GE Healthcare). Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των λακκασών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Lowry. Το μοριακό βάρος των λακκασών προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) ενώ το ισοηλεκτρικό σημείο αυτών με ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου (IEF-PAGE).

Για τις λακκάσες *PcLac1* και *PcLac2* πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών δράσης και λειτουργικής σταθερότητας, με χρήση του συνθετικού υποστρώματος ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) σε συγκέντρωση 2 mM στην αντίδραση. Η βέλτιστη τιμή pH δράσης του ενζύμου μελετήθηκε για το ρυθμιστικό σύστημα των διαλυμάτων κιτρικού-φωσφορικών, φωσφορικών και Tris-HCl (0,1 M), για εύρος τιμών pH μεταξύ 2-9. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των δύο λακκασών διερευνήθηκε στο εύρος 20-70 °C. Η μελέτη της σταθερότητας των λακκασών σε διαφορετικές τιμές pH πραγματοποιήθηκε με επώαση σε pH 2-9 και μέτρηση της ενεργότητας στις αντίστοιχες βέλτιστες συνθήκες δράσης. Αντίστοιχα η μελέτη της θερμοκρασιακής σταθερότητας πραγματοποιήθηκε για το θερμοκρασιακό εύρος 30-70 °C.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος οξειδωσης ενός φάσματος φαινολικών υποστρωμάτων, συγκέντρωσης 2 mM, με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Παράλληλα μελετήθηκε η εξειδίκευση των λακκασών ως προς τα υποστρώματα ABTS, 2,6-διμεθοξυφαινόλη, κατεχόλη, πυρογαλλόλη, γουαϊακόλη και υδροκινόνη. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 40 °C υπό ανάδευση σε pH 3 και 4 για τις *PcLac1* και *PcLac2* αντίστοιχα. Οι κινητικές σταθερές των ενζύμων προσδιορίστηκαν για τα υποστρώματα ABTS και 2,6-DMP. Η κινητική της *PcLac1* εξετάστηκε στο εύρος συγκεντρώσεων 1-5000 μM για το ABTS και 5-5000 μM για την 2,6-DMP σε pH 3 ενώ για την *PcLac2* οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις ήταν 10-5000 και 100-5000 μM σε pH 4. Παράλληλα μελετήθηκε η παρεμποδιστική δράση τεσσάρων οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα των ενζύμων, της μεθανόλης, της αιθανόλης, της ακετόνης και της 1,4-διοξάνης σε περιεκτικότητες 10 και 50 % και του DMSO σε περιεκτικότητα 10 %. Αντίστοιχα εξετάστηκε η επίδραση των παρεμποδιστικών παραγόντων NaCl (10 και 100 mM), NaN₃ (0,01 και 0,1 mM), EDTA (1 και 10 mM), SDS (0,1 και 1 mM), Cu (0,25 και 2,5 mM) και H₂O₂ (1 και 5 mM).

Ακόμη ελήφθη το φάσμα UV/Vis απορρόφησης στο εύρος 200-750 nm, για κάθε ένα από τα ενζυμικά διαλύματα προκειμένου να προσδιοριστούν οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των λακκασών. Τα φαινόμενα πρότυπα οξειδοαναγωγικά δυναμικά των λακκασών προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της κυκλικής βολταμετρίας εναλλασσόμενου ρεύματος διαταραχής μεγάλου πλάτους με μετασχηματισμό Fourier (large amplitude Fourier transform alternating current cyclic voltammetry, FTacV).

Τέλος μελετήθηκε η ικανότητα πολυμερισμού των δύο λακκασών για τα υποστρώματα φερουλικό οξύ, σιναπικό οξύ, κατεχόλη, γαλλικό οξύ και καφεϊκό οξύ. Οι ενεργότητες των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,16 Units mL⁻¹ στον αντιδρώντα όγκο και οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν για 24 ώρες στις βέλτιστες συνθήκες δράσης του κάθε ενζύμου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE διακρίνεται μία πρωτεϊνική ζώνη για κάθε ένζυμο. Το μοριακό βάρος της λακκάσης *PcLac1* εντοπίζεται περίπου στα 40 kDa ενώ για την λακκάση *PcLac2* είναι 80 kDa. Το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της λακκάσης *PcLac1* είναι περίπου 3,5, ενώ για την λακκάση *PcLac2* δεν παρατηρήθηκε ορατή πρωτεϊνική ζώνη κατά την ηλεκτροφόρηση IEF-PAGE.

Η *PcLac1* εμφανίζει βέλτιστο pH δράσης στην τιμή 4,5. Η ενεργότητα της λακκάσης διατηρείται σε ποσοστό >80%, στο εύρος pH 2,5 έως 5. Αντίστοιχα η *PcLac2* παρουσιάζει βέλτιστο pH δράσης στο pH 4, ενώ στο εύρος pH 3 με 4,5 το ένζυμο εμφανίζει ενεργότητα πάνω από 80%. Τόσο η *PcLac1* όσο και η *PcLac2* παρουσιάζουν βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 55°C. Συγκεκριμένα η *PcLac1* εμφανίζει > 60% της ενεργότητάς της στο εύρος 40-70°C ενώ η *PcLac2* έχει πάνω από 80% ενεργότητα στο θερμοκρασιακό εύρος 40-60°C. Η λακκάση *PcLac1* παρουσιάζει ικανοποιητική σταθερότητα στο εύρος pH 5 έως 9, διατηρώντας πάνω από το 95 % της ενεργότητάς της μετά από 24 h επώασης. Αντίστοιχα η *PcLac2* παρουσιάζει βέλτιστη σταθερότητα στο pH 7, με 90 % υπολειπόμενη ενεργότητα. Η μέγιστη σταθερότητα των ενζύμων λαμβάνεται κατόπιν επώασης στους 30 °C, με την *PcLac1* να διατηρεί το 70 % της ενεργότητάς της στις 24 h ενώ η *PcLac2* να διατηρεί στον ίδιο χρόνο το 82,5 %.

Από τη μελέτη οξειδωσης των διαφόρων υποστρωμάτων προέκυψε ότι οι δύο λακκάσες εμφανίζουν διαφορετική εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Η Pclac1 για παράδειγμα μπορεί να οξειδώσει κυρίως κατεχολικές δομές και υδροξυκιναμικά οξέα με υδροξύλιο σε ορθο-υποκατάσταση. Επιπλέον, το ένζυμο οξειδώνει ενώσεις διμεθοξυ-υποκατεστημένες, αλλά όχι φαινολικές αλκοόλες, αμίνες, αλδεΐδες ή υδροβενζοϊκά οξέα. Αντίστοιχα η Pclac2, οξειδώνει φαινολικές ενώσεις με κατεχολική δομή. Τα αποτελέσματα της μελέτης της εξειδίκευσης των λακκασών ως προς το υπόστρωμα φαίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Εξειδίκευση των λακκασών Pclac1 και Pclac2 ως προς το υπόστρωμα.

Ένζυμο	ABTS (U mg ⁻¹)	2,6 DMP (U mg ⁻¹)	Κατεχόλη (U mg ⁻¹)	Πυρογαλλόλη (U mg ⁻¹)	Γουαϊακόλη (U mg ⁻¹)	Υδροκινόνη (U mg ⁻¹)
Pclac1	1.48 ± 0.09	0.08 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.020 ± 0.001	0.003 ± 0.000	0.079 ± 0.003
Pclac2	4.78 ± 0.33	0.019 ± 0.003	0.04 ± 0.01	0.0390 ± 0.0003	0.0006 ± 0.0002	0.09 ± 0.02

Τα αποτελέσματα της μελέτης των κινητικών σταθερών Michaelis-Menten για τις δύο λακκάσες παρατίθενται στον Πίνακα 2. Σχετικά με τη μελέτη της επίδρασης παρεμποδιστικών παραγόντων, η λακκάση Pclac1 φαίνεται να είναι σχετικά ασταθής παρουσία των υπό εξέταση διαλυτών, διατηρώντας μόνο ένα ποσοστό της τάξης του 50% της ενεργότητας της σε περιεκτικότητα 10 % των διαλυτών. Αντίθετα, η Pclac2 παρουσιάζει καλύτερη σταθερότητα στους εξεταζόμενους διαλύτες. Η παρουσία μεθανόλης και αιθανόλης σε περιεκτικότητα 10 % στην αντίδραση δεν επηρεάζει τη δράση της, ενώ με αντίστοιχη περιεκτικότητα σε DMSO και ακετόνη το ένζυμο διατηρεί το 80 % της ενεργότητας του. Ως προς την παρουσία παρεμποδιστών η Pclac1 φαίνεται να ενεργοποιείται σε αντιδράσεις όπου συμπεριλαμβάνονται οι παράγοντες EDTA, H₂O₂ 1 mM και Cu, πετυχαίνοντας μάλιστα 1,3 φορές αύξηση της ενεργότητάς της για 0,25 mM Cu. Μικρή παρεμπόδιση της τάξης του 10 % εντοπίζεται για παράγοντες όπως SDS 0,1 mM ή H₂O₂ 5 mM. Αντιθέτως, η λακκάση Pclac2 χάνει το 20% της ενεργότητάς της παρουσία των παραγόντων NaCl 10 mM, EDTA, SDS 0,1 mM, H₂O₂ 1 mM και Cu.

Πίνακας 2. Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Michaelis-Menten για τις δύο λακκάσες και τα αντίστοιχα υποστρώματα.

Λακκάση	Υπόστρωμα	K _M (μM)	V _{max} (U mg ⁻¹)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} /K _M (μM ⁻¹ min ⁻¹)
Pclac1	ABTS	61±7	2,38±0,06	95±2	1,6±0,2
	2,6-DMP	672±56	0,36±0,01	14,2±0,5	0,021±0,002
Pclac2	ABTS	165±15	4,6±0,1	369±9	2,2±0,2
	2,6-DMP	1070±105	0,041±0,002	3,3±0,2	0,0030±0,0003

Από τα φάσματα UV-Vis των δύο λακκασών παρατηρούμε ότι η Pclac1 δεν εμφανίζει τη χαρακτηριστική απορρόφηση των μπλε λακκασών στα 610 nm ενώ στην περιοχή των 330 nm καταγράφεται μία μικρή κορυφή, αποτέλεσμα που υποδεικνύει ότι πιθανά πρόκειται για μια κίτρινη λακκάση. Αντίστοιχα η Pclac2 εμφανίζει μια κορυφή μικρής έντασης γύρω στα 300 nm και στα 600 nm. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η Pclac2 ανήκει στις μπλε λακκάσες. Το φαινόμενο πρότυπο οξειδαναγωγικό δυναμικό, της Pclac1 εμφανίζεται στα 260 mV. Αντίστοιχα για την Pclac2 η οξειδοαναγωγική κορυφή καταγράφεται περίπου στα 200 mV.

Το συνθετικό δυναμικό των δύο λακκασών εξετάστηκε σε αντιδράσεις σύνθεσης με μονομερή την κατεχόλη, το γαλλικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το σιναπικό οξύ και το καφεϊκό οξύ. Το καφεϊκό οξύ δεν έδωσε αδιάλυτο στερεό ίζημα μετά από 24 ώρες αντίδρασης. Η κατεχόλη και το γαλλικό οξύ,

ενώ σχημάτισαν αδιάλυτα πολυμερή, η ποσότητα αυτών δεν ήταν μετρήσιμη. Αντίθετα, για τα υποστρώματα σιναπικό οξύ και φερουλικό οξύ σημειώθηκαν σημαντικές αποδόσεις σε παραγωγή αδιάλυτου ιζήματος. Μάλιστα ως προς το σιναπικό οξύ, η *PcLac1* απέδωσε 36 % μάζα προϊόντος προς μάζα υποστρώματος ενώ η *PcLac2* παρουσίασε απόδοση 81,2 %. Οι αποδόσεις των αντιδράσεων των ενζύμων σε στερεά προϊόντα παρατίθενται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα αντιδράσεων σύνθεσης των λακκασών *PcLac2* και *PcLac1* σε φαινολικά υποστρώματα.

Λακκάση Υπόστρωμα	<i>PcLac1</i> Σιναπικό οξύ	<i>PcLac1</i> Φερουλικό οξύ	<i>PcLac2</i> Σιναπικό οξύ
$m_{\text{προϊόντος}} / V_{\text{αντίδρασης}} \text{ (mg mL}^{-1}\text{)}$	1,13	0,21	2,54
$m_{\text{προϊόντος}} / \text{Ενζυμική ενεργότητα}$ αντίδρασης (mg Unit ⁻¹)	0,73%	0,14%	1,40%
$m_{\text{προϊόντος}} / m_{\text{υποστρώματος}} \text{ (mg mg}^{-1}\text{)}$	36,0%	6,8%	81,2%

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τις τελευταίες δεκαετίες η επιστημονική έρευνα στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς την ανάπτυξη σύγχρονων βιοδιυλιστηρίων, με στόχο την κατεργασία λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για παραγωγή βιοκαυσίμων νέας γενιάς, καθώς και εμπορικών χημικών ενώσεων. Οι λακκάσες εν προκειμένω συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον λόγω της ικανότητάς τους να τροποποιούν τη λιγνίνη αλλά και πλήθος άλλων ρύπων και υποστρωμάτων βιοτεχνολογικής αξίας [3]. Ουσιαστικά, τα ένζυμα αυτά αποτελούν ένα σημαντικό, εν δυνάμει, εργαλείο για την επίτευξη «πράσινων διεργασιών» στην βιοτεχνολογική βιομηχανία.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός δύο καινοτόμων λακκασών, της *PcLac1* και της *PcLac2*. Τα δύο ένζυμα, παρά το γεγονός ότι προέρχονται από τον ίδιο μικροοργανισμό παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες. Ενώ παρουσιάζουν παρόμοιες συνθήκες βέλτιστης δράσης, εμφανίζουν διαφορετική λειτουργική σταθερότητα, διαφορετικά πρότυπα οξειδοαναγωγικά δυναμικά και διαφορετική εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Ως εκ τούτου παρέχεται η δυνατότητα τα δύο αυτά ένζυμα να αξιοποιηθούν κατά περίπτωση σε πλήθος βιοτεχνολογικών εφαρμογών, στις οποίες οι απαιτούμενες συνθήκες δράσης ποικίλουν.

Οι βιομηχανικές διεργασίες οξείδωσης, με βάση τα συστήματα των λακκασών, αυξάνονται σημαντικά τα τελευταία χρόνια, δίνοντας έμφαση στην εκμετάλλευση της συνθετικής ικανότητας των συγκεκριμένων βιοκαταλυτών. Συγκεκριμένα η έρευνα στρέφεται προς μια αποδοτική προσέγγιση σύνθεσης ομο- και ετερο-διμερών ενώσεων από φαινολικά παράγωγα ή παράγωγα αμινών, με διεργασίες φιλικές προς το περιβάλλον [7]. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το συνθετικό δυναμικό των *PcLac1* και *PcLac2*, χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα φαινολικά οξέα. Οι αποδόσεις των αντιδράσεων σε στερεό προϊόν ήταν υψηλές, υποδεικνύοντας την δυναμική των λακκασών για αξιοποίηση στον τομέα των οργανικών συνθέσεων. Μάλιστα η δράση των λακκασών είναι δυνατόν να οδηγήσει στην παραγωγή καινοτόμων προϊόντων με καινούριες ιδιότητες, όπως φωτοπροστατευτική, αντιμικροβιακή ή αντιοξειδωτική δράση. Ως μελλοντικός στόχος είναι δυνατόν να τεθεί η ταυτοποίηση των στερεών αυτών προϊόντων και ο προσδιορισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, οι οποίες μπορεί να αποβούν πολύτιμες για τον σχεδιασμό νέων βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το έργο χρηματοδοτείται από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) και από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ), με αρ. Σύμβασης Έργου 1085.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] V. Perna, J.W. Agger, J. Holck, A.S. Meyer. SCIENTIFIC REPORTS 8 (8114) (2018)
- [2] Z.K. Bagewadi, S.I. Mulla, H.Z. Ninnekar. J. of Genetic Engineering and Biotechnology 15 (2017) 139–150
- [3] S. Roth, A.C. Spiess. Bioprocess Biosyst Eng (2015) DOI 10.1007/s00449-015-1475-7
- [4] W.T. Huang, R. Tai, R.S. Hseu, C.T. Huang. Process Biochemistry 46 (2011) 1469–1474.
- [5] M.J.M. Maciel, A.C. Silva, H.C.T. Ribeiro. Electronic Journal of Biotechnology 13 (6) (2010).
- [6] P. Baldrian. Federation of European Microbiological Societies FEMS Microbiol Rev 30 (2006) 215–242
- [7] S. Riva. TRENDS in Biotechnology 24 (5) (2006) 219-226.
- [8] E. Rodriguez, O. Nuero, F. Guillen, A.T. Martinez, M.J. Martinez. Soil Biol. & Biochem. 36(2004) 909–916.
- [9] A. Leonowicz, N.S. Cho, J. Luterek, A. Wilkolazka, M.W. Wasilewska, A. Matuszewska, M. Hofrichter, D. Wesenberg, J. Rogalski. Journal of Basic Microb. 41(3–4) (2001) 185–227.