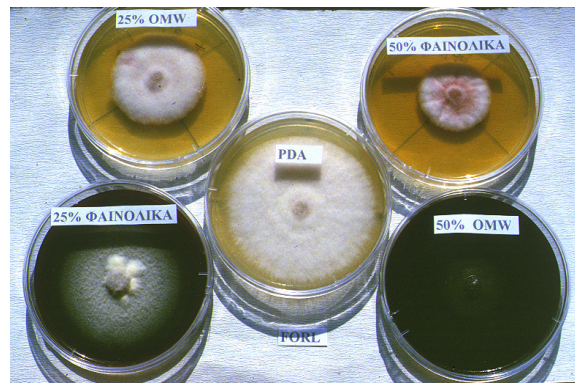


Εργαστηριακές Ασκήσεις

Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας



Δημήτρης Καρπούζας

Εργαστηριακές ασκήσεις 1 και 2

Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας σε καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης

Οι μύκητες λευκής σήψης αποτελούν μια ομάδα μυκήτων με κοινά οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά παρά μια ομάδα ταξινομικά διακριτή. Οι μύκητες λευκής σήψης αποτελούν σαπροφυτικούς βασιδιομύκητες στην συντριπτική τους πλειοψηφία και προκαλούν χαρακτηριστική λευκή σήψη όταν αναπτύξουν το μυκήλιο τους σε νεκρή οργανική ύλη όπως ξύλα και γενικά υποστρώματα πλούσια σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη.



Οι μύκητες λευκής σήψης θεωρήθηκαν ιδανικοί για την βιολογική απορρόπηση οργανικών ρύπων διότι:

1. Παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα κάτι που συνεπάγεται ότι δεν απαιτείται η είσοδος του ρύπου στο κύτταρο για να επέλθει η διάσπαση του αλλά και είναι δυνατή η διάσπαση ακόμη και ρύπων που είναι προσροφημένοι στα εδαφικά κολλοειδή
2. Τα ένζυμα που παράγουν είναι χαμηλής εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα που θα διασπάσουν με αποτέλεσμα να μπορούν να επιτελέσουν τουλάχιστον τα

πρώτα καταβολικά βήματα στην διάσπαση δύσκολα βιοαποδομήσιμων οργανικών ρύπων

Τι ένζυμα παράγουν οι μύκητες λευκής σήψης ;

- Εξαρτώμενες της λιγνίνης υπεροξειδάσες (LiP): Οξειδώνουν μη φαινολικά τμήματα της λιγνίνης αφαιρώντας ένα e^- και δημιουργώντας μια κατιονική ρίζα που στην συνέχεια αποδομούνται με χημικές διεργασίες
- Εξαρτώμενες του μαγγανίου υπεροξειδάσες (MnP): Οξειδώνει Mn^{+2} σε Mn^{+3} που στην συνέχεια οξειδώνει φαινολικούς δακτυλίους δημιουργώντας φαινοξικές ρίζες που είναι ασταθείς και δασπώνται χημικά
- Λακάσες (Lac): αποτελεί μια Cu-οξειδάση (EC 1.10.3.2) που χρησιμοποιούν ένα μοριακό οξυγόνο ως οξειδωτικό και οξειδώνουν φαινολικούς δακτυλίου προς φαινοξικές ρίζες

Οι περισσότεροι μύκητες λευκής σήψης εάν τους αφήσουμε να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο θα δώσουν καρποφορίες που είναι τα γνωστά μας μανιτάρια



Οι μύκητες λευκής σήψης έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για την ικανότητα τους να διασπούν οργανικούς ρύπους (Pointing et al., 2001) όπως:

- Πολυαρωματικούς Υδρογονάνθρακες
- Γεωργικά φάρμακα
- Πολυχλωριωμένα διφαινύλια
- TNT και άλλες εκρηκτικές ύλες

Εργαστηριακή άσκηση 1. Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού λακκάσης σε καλλιέργειες μυκήτων λευκής σήψης

Λακκάση

Η λακκάση ανήκει στην κατηγορία των οξειδασών. Περιέχει πολλά ενεργά κέντρα ιόντων χαλκού και η δράση της συνοδεύεται από αναγωγή του οξυγόνου σε νερό. Η δομή του ενζύμου περιλαμβάνει 4 ενεργά κέντρα χαλκού (T1, T2, T3, T4), με τη βοήθεια των οποίων ανάγουν το οξυγόνο. Στο ενεργό κέντρο χαλκού T1 προκαλείται η οξείδωση του υποστρώματος, με ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίων στα T2 και T3 άτομα χαλκού.

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν τα τυπικά υποστρώματα δράσης του ενζύμου λακκάση. Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών, πραγματοποιείται μέσω μιας διαδικασίας μεταφοράς ηλεκτρονίων, κατά την οποία, με τη αφαίρεση ενός πρωτονίου σχηματίζεται μια φαίνοξυ ρίζα. Η λακκάση, ως ένζυμο, έχει υψηλή θερμική αντοχή (σταθερή στους 60 °C), με ικανότητα να δρα σε μεγάλο εύρος ουσιών (σχετικά μικρή εκλεκτικότητα στο υπόστρωμα), οξειδώνοντας έτσι ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών αρωματικών ενώσεων.

Σε κάθε πάγκο υπάρχουν δείγματα από καλλιέργειες τριών διαφορετικών μυκήτων λευκής σήψης σε θρεπτικό μέσο εκχυλίσματος αχύρου. Κάθε ομάδα θα πάρει από δύο δείγματα και θα ακολουθήσει την διαδικασία προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση

Στελέχη μυκήτων λευκής σήψης

- *Phanerochaete chrysosporium* DSM 6909
- *Trametes versicolor* DSM 11309
- *Pleurotus ostreatus* DSM 1020

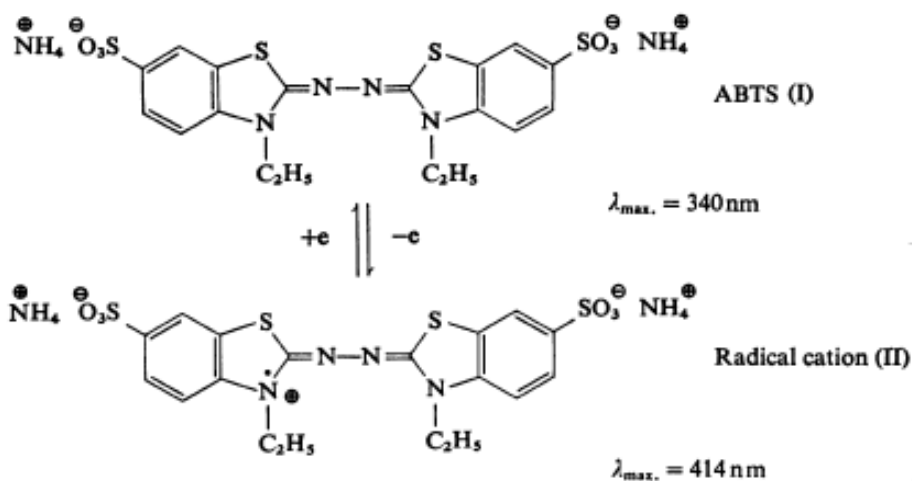
Υλικά και όργανα

- Δείγματα υγρών καλλιεργειών μυκήτων
- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο

- Χρονόμετρο
- 2,2 – azinobis – 3 – ethylbenzothiazolin – 6 – sulfonic acid (ABTS)
- Τρυγικό Νάτριο (pH 4.5)

Θα πρέπει με την παρακάτω διαδικασία να προσδιορίσετε την ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου λακάση στις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης που θα εξετάσετε

- Σε κυψελίδα γίνεται προσθήκη **1.2 ml τρυγικού νατρίου 0.1M** (pH ρυθμίστηκε σε τιμή 4.5 με προσθήκη NaOH)
- Προσθήκη **0.8 ml από την καλλιέργεια του μύκητα**
- Μηδενισμός του φωτομέτρου
- Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης **προσθέτονται 0.4 ml ABTS (2,2 – azinobis – 3 – ethylbenzothiazolin – 6 – sulfonic acid)** συγκεντρώσεως 1.5 mM και ανάδευσή του με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας (Εικόνα 1)
- Μέτρηση απορρόφησης στα 425 nm ανά διαστήματα 20 sec μέχρι το τέλος της αντίδρασης (3 min).



Εικόνα 1. Το ABTS παρουσία του ενζύμου λακάση υφίσταται οξείδωση που οδηγεί στην παραγωγή της κατιονικής ρίζας (II) που παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 425 nm και μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά.

Υπολογισμός της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου λακάση

$$\text{Laccase activity} = [d(A425 \text{ nm}) / (dt \text{ (min)} \times E \text{ (lt/mol.cm)})] \times V_{\text{reaction}} \text{ (ml)} / V_{\text{sample}} \text{ (ml)}$$

d(A425nm): η μέγιστη διαφορά της απορρόφησης που μετρήθηκε στα 3 min

dt: χρονικό διάστημα μεταξύ των μετρήσεων (σε min)

E: είναι ο συντελεστής απόσβεσης (σε lt/mol.cm) = 36 lt/mol.cm

V_{reaction}: είναι ο τελικός όγκος της αντίδρασης στην κυψελίδα (σε ml)

V_{sample}: είναι ο αρχικός όγκος της καλλιέργειας που πάρθηκε το δείγμα (σε ml)

Αποτελέσματα Lac

Δείγμα	Ενζυμική δραστηριότητα Λακάσης (Units / mL)
1	
2	
3	

1 U είναι η ποσότητα του ενζύμου που οξειδώνει 1 μmol ABTS / min

Εργαστηριακή άσκηση 2. Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού MnP σε καλλιέργειες μυκήτων λευκής σήψης

Υπεροξειδάση εξαρτώμενη του Mn (MnP)

Η Mn-υπεροξειδάση ανήκει στην κατηγορία των αιμο-υπεροξειδασών, η δράση της οποίας είναι εξαρτώμενη από την παρουσία του μαγγανίου, προκαλώντας την αποδόμηση φαινολικών συστατικών και άλλων αρωματικών ενώσεων. Διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι μύκητες λευκής σήψεως, όπως ο *Phanerochaete chrysosporium*, με τη βοήθεια της Mn-υπεροξειδάσης που παράγουν, παρουσιάζουν την ικανότητα να αποδομούν πλήθος ενώσεων με ρυπογόνο δράση, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών συστατικών.

Η δράση του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση, είναι παρόμοια με αυτή των άλλων υπεροξειδασών. Έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια της δράσης του ενζύμου αυτού, η σιδηρούχος Mn-υπεροξειδάση οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε ένα σιδηρούχο-π-πορφυρικό κατιόν, γνωστό ως **συστατικό I**. Η Mn-υπεροξειδάση θεωρείται απόλυτα εξαρτώμενη από το Mn (II), καθώς παρουσία Mn (II) είναι εφικτή η πραγματοποίηση δυο διαδοχικών αναγωγών, πρώτα του συστατικού I σε ένα συστατικό, γνωστό στη βιβλιογραφία ως συστατικό II, και έπειτα πάλι στο αυτούσιο ένζυμο (E).

- $E + H_2O_2 \longrightarrow \text{Συστατικό I} + H_2O$
- $\text{Συστατικό I} + Mn^{+2} \longrightarrow \text{Συστατικό II} + Mn^{+2}$
- $\text{Συστατικό II} + Mn^{+2} \longrightarrow E + \underline{Mn^{+3}} + H_2O$

Παρουσία περίσσειας H_2O_2 σε σχέση με την συγκέντρωση του Mn^{+2} το πρώτο μπορεί αντιδράσει με το συστατικό II της Mn-υπεροξειδάσης, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα υπεροξικό σύμπλοκο γνωστό και ως συστατικό III που προκαλεί και την απενεργοποίηση της Mn-υπεροξειδάσης.

- $\text{Συστατικό II} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Συστατικό III}$

Σε κάθε πάγκο υπάρχουν δείγματα από καλλιέργειες τριών διαφορετικών μυκήτων λευκής σήψης σε θρεπτικό μέσο εκχυλίσματος αχύρου. Θα επιλέξετε και θα προσδιορίσετε την ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου MnP σε δύο από τα τρία δείγματα ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία.

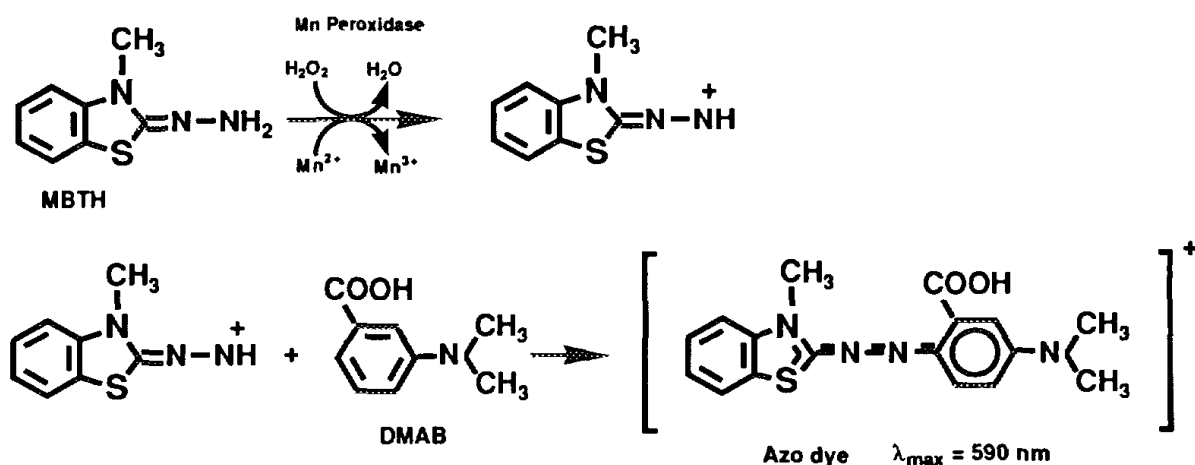
Στελέχη μυκήτων λευκής σήψης

- *Phanerochaete chrysosporium* DSM 6909
- *Trametes versicolor* DSM 11309
- *Pleurotus ostreatus* DSM 1020

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου MnP πραγματοποιείται σε τρία διαδοχικά στάδια

1. Προσδιορισμός της **παρεμβολής του υποστρώματος** στην δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (εξαρτημένου ή μη του Mn)
2. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένου του Mn)
3. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου MnP στηρίζεται στην οξειδωτική σύζευξη των **MBTH** και **DMAB** που παρουσία H_2O_2 και Mn^{+2} και του ενζύμου MnP δίνει βαθύ μωβ-μπλέ χρώμα που παρουσιάζει max απορρόφηση στα 590 nm



Υλικά και Όργανα

- Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- Αυτόματη πιπέτα των 100 μl
- Αυτόματη πιπέτα των 200 μl
- Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος στο οποίο προστέθηκε γαλακτικό νάτριο για τη ρύθμιση του pH στην τιμή 4.5
- 3 – dimethylaminobenzoic acid (DMAB)
- 3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride (MBTH)
- 10 mM H₂O₂ (Μόνο για μη – εξαρτώμενη του Mn και εξαρτώμενη του Mn υπεροξειδάση)
- 20 mM MnSO₄ (Μόνο για εξαρτώμενη του Mn υπεροξειδάση)

1. Προσδιορισμός της παρεμβολής του υποστρώματος στην δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (εξαρτημένου ή μη του Mn)

- Προσθήκη **1 ml διαλύματος ηλεκτρικού οξέος συγκέντρωσης 0.1 M** σε κυψελίδα
- **0.2 ml διαλύματος DMAB 25 mM**
- **0.1 ml διαλύματος MBTH 1 mM**
- Ανάδευση του όγκου της κυψελίδας
- **Μηδενισμός του φωτομέτρου**
- Προσθήκη **0.66 ml δείγματος από την καλλιέργεια του μύκητα**
- Παρακολούθηση απορρόφησης ανά 20 sec μέχρι το τέλος της αντίδρασης

Η παρεμβολή του υποστρώματος υπολογίζεται ως ακολούθως:

$$\text{Background activity} = [d(A_{590 \text{ nm}})/(dt \text{ (min)} \times E \text{ (lt/mol.cm)})] \times V_{\text{reaction(ml)}/V_{\text{sample (ml)}}$$

$$E \text{ (lt/mol.cm)} = 32.9 \text{ lt/mol.cm}$$

$$V_{\text{reaction}} = 1.96 \text{ ml}$$

$$V_{\text{sample}} = 50 \text{ ml}$$

$$dt = 20/60 = 0.333 \text{ min}$$

2. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένου του Mn)

- Προσθήκη **1 ml διαλύματος ηλεκτρικού οξέος συγκέντρωσης 0.1 M** σε κυψελίδα
- **0.2 ml διαλύματος DMAB 25 mM**
- **0.1 ml διαλύματος MBTH 1 mM**
- Προσθήκη **0.66 ml δείγματος από την καλλιέργεια του μύκητα**
- Ανάδευση του όγκου της κυψελίδας
- **Μηδενισμός του φωτομέτρου**
- Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης **προστίθενται 0.01 ml διαλύματος H₂O₂ συγκεντρώσεως 10 mM**
- Παρακολούθηση απορρόφησης ανά 20 sec μέχρι το τέλος της αντίδρασης

Η δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενου του Mn) υπολογίζεται ως ακολούθως :

$$AP = \text{Independent peroxidase activity} + \text{Background activity} = [d(A_{590 \text{ nm}})/(dt \text{ (min)} \times E \text{ (lt/mol.cm)})] \times V_{\text{reaction}} \text{ (ml)}/V_{\text{sample}} \text{ (ml)}$$

$$E \text{ (lt/mol.cm)} = 32.9 \text{ lt/mol.cm}$$

$$V_{\text{reaction}} = 1.97 \text{ ml}$$

$$V_{\text{sample}} = 50 \text{ ml}$$

$$dt = 20/60 = 0.333 \text{ min}$$

Η υπεροξειδάση (μη εξαρτημένη του Mn) υπολογίζεται από την AP με αφαίρεση της παρεμβολής του υποστρώματος (Background activity), δηλαδή:

$$\text{Independent peroxidase activity} = AP - \text{Background activity}$$

3. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου *Mn*-υπεροξειδάση

- Προσθήκη 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού οξέος συγκέντρωσης 0.1 M σε κυψελίδα
- **0.2 ml διαλύματος DMAB 25 mM**
- **0.1 ml διαλύματος MBTH 1 Mm**
- Προσθήκη 0.66 ml δείγματος από την καλλιέργεια του μύκητα
- Προσθήκη 0.01 ml διαλύματος MnSO₄ συγκέντρωσης 20 mM
- Ανάδευση του όγκου της κυψελίδας
- **Μηδενισμός του φωτομέτρου**
- Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστίθενται 0.01 ml διαλύματος H₂O₂ συγκεντρώσεως 10 mM
- Παρακολούθηση απορρόφησης ανά 20 sec μέχρι το τέλος της αντίδρασης

Η δραστηριότητα του ενζύμου Mn- εξαρτώμενη υπεροξειδάση υπολογίζεται ως ακολούθως :

$$\text{Mn-peroxidase activity} + \text{Independent peroxidase activity} + \text{Background activity} = [d(A_{590 \text{ nm}})/(dt \text{ (min)} \times E \text{ (lt/mol.cm)})] \times V_{\text{reaction}} \text{ (ml)} / V_{\text{sample}} \text{ (ml)}$$

$$E \text{ (lt/mol.cm)} = 32.9 \text{ lt/mol.cm}$$

$$V_{\text{reaction}} = 1.98 \text{ ml}$$

$$V_{\text{sample}} = 50 \text{ ml}$$

$$dt = 20/60 = 0.333 \text{ min}$$

Η Mn-εξαρτώμενη υπεροξειδάση υπολογίζεται από την AP με αφαίρεση της παρεμβολής του υποστρώματος (Background activity), δηλαδή:

$$\text{Mn-peroxidase activity} = AR - AP$$

Αποτελέσματα MnP (Units / mL)

Δείγματα	Παρεμβολή υποστρώματος	Μη εξαρτώμενη υπεροξειδάση	Mn – εξαρτώμενη υπεροξειδάση
1			
2			
3			

Σχετική Βιβλιογραφία

Pointing SB (2001) Feasibility of bioremediation by white – rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 20-33.

Reddy CA, D'Souza TM (1994) Physiology and molecular biology of the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Reviews* 13, 137-152

Kullman SW, Matsumura F (1996) Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* degradation of the cyclodien pesticide endosulfan. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 593-600

Pizzul L, Castillo MdP, Stenstrom J (2009) Degradation of glyphosate and other enzymes by lignolytic enzymes. *Biodegradation* 20:751–759

Asgher M, Bhatti HN, Ashraf M, Legge RL (2008) Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19:771–783

Karas P., Perucchon C., Exarhou C., Ehalotis C., Karpouzas DG., (2011) Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. *Biodegradation* 22: 215-228.