



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΛΑΚΚΑΣΗ, ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΜΗ ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΗΣ Μn  
ΚΑΙ Μn-ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ

ΚΑΡΑΣΜΑΝΟΓΛΟΥ ΟΔΥΣΣΕΑΣ

ΣΑΜΑΡΑΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2015

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΛΑΚΚΑΣΗ, ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΜΗ ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΗΣ Μn  
ΚΑΙ Μn-ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ

ΚΑΡΑΣΜΑΝΟΓΛΟΥ ΟΔΥΣΣΕΑΣ

Υποβολή πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του πτυχίου του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης.

12/2/2015

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων Δρ. Ζώτο Αναστάσιο και τον Δρ.Καραγιαννακίδη Παναγιώτη για την βοήθεια και την αμέριστη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης των πειραμάτων και της γραπτής εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η επίδραση παραγόντων, όπως η θερμοκρασία και το pH, καθώς και ουσιών που παίζουν το ρόλο του επιταχυντή ή του αναστολέα ( $MgCl_2$ ,  $NaN_3$ ,  $CuCl_2$  κ.α.) στη δραστικότητα του ενζύμου λακκάση. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου καλλιέργειας μανιταριών ποικιλίας *Pleurotus* στη δραστικότητα των ενζύμων λακκάσης, υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάσης.

Διαπιστώθηκε ότι άριστη θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου της λακκάσης ήταν  $40^\circ C$  και άριστο pH το 5. Παρατηρήθηκε ότι οι ουσίες  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $C_2H_4INO_3$  δρουν ως επιταχυντές τους ενζύμου της λακκάσης, ενώ οι ουσίες  $AgNO_3$ ,  $NaN_3$ ,  $C_6H_4O_2$ , DTT ως αναστολείς και οι ουσίες KCl και  $NH_4Cl$  δεν επηρέασαν την ενζυμική δράση.

Εντονότερη ενζυμική δραστικότητα για τα ένζυμα της λακκάσης και Mn-υπεροξειδάσης κατά την ανάπτυξη καλλιέργειας μανιταριών παρατηρήθηκε μεταξύ της τέταρτης και πέμπτης εβδομάδας.

Διαπιστώθηκε επίσης τα ένζυμα λακκάση, υπεροξειδάση μη εξαρτημένη Mn και Mn-υπεροξειδάση μπορούν να διατηρήσουν την ενζυμική τους δραστικότητα σε συνθήκες ψύξης μέχρι και 5 εβδομάδες, οπότε διαπιστώνεται και η πτωτική πορεία της δραστικότητάς τους με αδρανοποίηση όλως των ενζύμων κατά την 7<sup>η</sup> εβδομάδα.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση .....	9
2.1 Βασικές έννοιες για τα ένζυμα .....	9
2.1.1 Δομή των ενζύμων.....	9
2.1.2 Ονοματολογία-ταξινόμηση των ενζύμων .....	10
2.1.3 Εξειδίκευση των ενζύμων.....	12
2.1.4 Καταλυτική δράση-Ενεργό κέντρο .....	12
2.2 Διαχωρισμός των ενζύμων .....	13
2.2.1 Διαχωρισμός με φυγοκέντριση .....	14
2.2.2 Άλλες μέθοδοι διαχωρισμού.....	16
2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική δραστικότητα .....	16
2.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστικότητα .....	16
2.3.2 Επίδραση του pH στην ενζυμική δραστικότητα.....	17
2.3.3 Επίδραση του νερού στην ενζυμική δραστικότητα .....	18
2.3.4 Επίδραση της πίεσης στην ενζυμική δραστικότητα.....	19
2.4 Επιταχυντές .....	19
2.5 Αναστολείς.....	20
2.6 Λακκάση .....	21
2.7 Υπεροξειδάση .....	22
3 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας.....	24
4 Πειραματικά δεδομένα .....	24
4.1 Υλικά και όργανα.....	24
4.1.1 Μανιτάρια Pleurotus (εμπορίου).....	24
4.1.2 Καλλιέργεια μανιταριών Pleurotus .....	25
4.1.3 Αντιδραστήρια.....	25
4.1.4 Όργανα .....	26
4.2 Μέτρηση απορρόφησης των ενζύμων.....	26
4.2.1 Μέτρηση απορρόφησης του ενζύμου λακκάση (υλικά και μέθοδος).....	26
4.2.2 Μέτρηση απορρόφησης του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn) (υλικά και μέθοδος).27	
4.2.3. Μέτρηση απορρόφησης του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση (υλικά και μέθοδος). .....	27
4.2.4 Προσδιορισμός επιταχυντών και αναστολέων του ενζύμου λακκάση.....	27
4.3 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας επώασης στην απορρόφηση της λακκάσης, σε μανιτάρια Pleurotus εμπορίου.....	28
4.4 Μελέτη της επίδρασης του pH στην απορρόφηση της λακκάσης σε μανιτάρια Pleurotus εμπορίου. ....	28

4.5 Μελέτη επίδρασης επιταχυντών και αναστολέων στην απορρόφηση της λακκάσης σεμανιτάρια Pleurotus εμπορίου .....	28
4.6 Μελέτη του χρόνου στην απορρόφηση της λακκάσης σεμανιτάρια Pleurotus εμπορίου .....	28
4.7 Μελέτη του χρόνου στην απορρόφηση της υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης Mn και της Mn-υπεροξειδάσης σεμανιτάρια Pleurotus εμπορίου .....	29
4.8 Μελέτη της απορρόφησης των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάση κατά την ανάπτυξη καλλιέργειαςμανιταριών Pleurotus .....	29
5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	29
5.1 Άριστη θερμοκρασία επώασης .....	29
5.2 Άριστο pH .....	31
5.3 Επιταχυντές και αναστολείς .....	32
5.4 Χρόνος καλλιέργειας .....	35
5.4.1 Καλλιέργειαμανιταριών Pleurotus .....	35
5.4.2 Σύγκριση με καλλιέργεια από υγρά απόβλητα ελαιουργείου. ....	39
5.5 Χρόνος επίδρασης του ενζύμου .....	43
6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	46
7. ΠΡΩΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΕΤΑΙΡΟ ΜΕΛΕΤΗ .....	46



## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πολλά είδη μανιταριών (π.χ. *Laccaria laccata*, *Boletus*, *Lactarius*, κ.α.) αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με τις ρίζες φυτών όπου και αποδεικνύονται ζωτικής σημασίας για την επιβίωσή τους. Ο αριθμός τους ανέρχεται σε 75.000 με 100.000 είδη μανιταριών εκ των οποίων τα 2.000 είναι εδώδιμα. Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί 2.500 είδη μυκήτων από τα οποία τα 900 είναι μανιτάρια.

Η καλλιέργεια μανιταριών σε όλο τον κόσμο ξεπερνά τους 10 εκατ. τόνους ετησίως. Η Κίνα είναι μακράν η πρώτη χώρα σε παραγωγή καλύπτοντας το 75% της παγκόσμιας αγοράς. Στην Ευρώπη ηγετικές θέσεις καταλαμβάνουν η Ολλανδία και η Πολωνία. Στην Ελλάδα παρότι το κλίμα ευνοεί την καλλιέργεια μανιταριών, η παραγωγή δεν καλύπτει την ζήτηση και συνεπώς πραγματοποιούνται εισαγωγές από όλο τον κόσμο. Δύο είδη μανιταριών καλλιεργούνται σε επιχειρηματική βάση στην Ελλάδα, το λευκό μανιτάρι (*Agaricus*), και το πλευρωτό μανιτάρι (*Pleurotus*). Η τάση στην χώρα αφορά την μείωση της παραγωγής των μανιταριών *Agaricus* και την παράλληλη αύξηση της παραγωγής των μανιταριών *Pleurotus*.

Τα μανιτάρια περιέχουν μεγάλο αριθμό ενζύμων τα οποία παρουσιάζουν ενδιαφέρον κάποια εκ των οποίων η λακκάση, η οποία παρουσιάζει υψηλή θερμική αντοχή και είναι το κύριο ένζυμο που καταλύει την οξειδωση πολλών οργανικών αρωματικών υποστρωμάτων και βοηθά στην αποδόμηση κυρίως φαινολικών συστατικών, όπου με τη συνδιαστική δράση διάφορων ουσιών (επιταχυντές) μειώνεται ο χρόνος κατάλυσης των ουσιών και η υπεροξειδάση, η οποία βρίσκεται σε μορφή εξαρτημένης μαγγανίου και μη εξαρτημένης μαγγανίου και δρα ως καταλύτης, συγκεκριμένα προωθεί την οξειδωση διάφορων ενώσεων.

Η θερμοκρασία και το pH είναι παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση του ενζύμου λακκάση, καθώς με μεταβολή τους προκαλούν και μεταβολή στην ενζυμική απορρόφηση κατά τη μέτρησή της σε φασματοφωτόμετρο. Μεταβολή στη δράση του ενζύμου λακκάση προκαλούν και διάφορες ουσίες οι οποίες παίζουν το ρόλο του επιταχυντή ή του αναστολέα σε μία αντίδραση, άρα προκαλούν και μεταβολή στη μέτρηση της απορρόφησης του ενζύμου.

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της μεταβολής της απορρόφησης των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάσης κατά την ανάπτυξη



καλλιέργειας μανιταριών ποικιλίας *Pleurotus*, καθώς και η επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και η προσθήκη διάφορων ουσιών στη μεταβολή της απορρόφησης του ενζύμου λακκάση.

## 2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση

### 2.1 Βασικές έννοιες για τα ένζυμα

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες με ισχυρή καταλυτική δραστηριότητα. Συντίθενται από βιολογικά κύτταρα και σε όλους τους οργανισμούς, συμμετέχουν στις σχετικές με το μεταβολισμό χημικές αντιδράσεις. Έτσι ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα επίσης σε πολλά τρόφιμα και με αυτό τον τρόπο βελτιώνουν ή υποβαθμίζουν την ποιότητα των τροφίμων. Τέτοια παραδείγματα είναι η ωρίμανση των φρούτων, το σίτεμα του κρέατος, η ωρίμανση γαλακτοκομικών προϊόντων και η παραγωγή αλκοολούχων ποτών από σιτάρι (Belitz, 2006).

Τα ένζυμα κατατάσσονται στις λειτουργικές πρωτεΐνες, εκείνες δηλαδή που χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να δεσμεύουν επιλεκτικά ορισμένες ουσίες, που για τα ένζυμα καλούνται υποστρώματα. Το αποτέλεσμα της δέσμευσης του ενζύμου με το υπόστρωμα είναι η χημική μεταβολή του υποστρώματος, ενώ το ένζυμο στο τέλος της αντίδρασης παραμένει αμετάβλητο και έτοιμο να δεσμεύσει νέο υπόστρωμα (Γεωργιάτσος, 1991 ; Belitz, 2006).

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των ενζύμων είναι η εξειδίκευση της καταλυτικής τους δράσης. Αυτό αφορά τόσο στο είδος της αντίδρασης όσο και στο είδος του υποστρώματος πάνω στο οποίο δρα το ένζυμο (Ηλιόπουλος, 1998).

#### 2.1.1 Δομή των ενζύμων

Τα ένζυμα είναι σφαιρικές πρωτεΐνες με διαφορετικά μεγέθη μορίων. Η πρωτεϊνική δομή καθορίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων και από την δευτεροταγή και τριτοταγή δομή διαμόρφωσή της, όπως προκύπτουν από την συγκεκριμένη αλληλουχία. Τα μεγαλύτερα ενζυμικά μόρια αποτελούνται συχνά από δύο ή περισσότερες πεπτιδικές αλυσίδες που διευθετούνται σε συγκεκριμένη τεταρτοταγή δομή. Η τρισδιάστατη μορφή του ενζυμικού μορίου ευθύνεται για την εξειδίκευσή του και τον αποτελεσματικό ρόλο του ως καταλύτη. Η πρωτεϊνική φύση του ενζύμου είναι υπεύθυνη για τον περιορισμό της δραστηριότητάς του σε μία μικρή σχετικά περιοχή του pH και για την απώλεια δραστηριότητας λόγω μετουσίωσης κατά την θερμική επεξεργασία. Μερικά ένζυμα είναι σύμπλοκα που αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό τμήμα που δεσμεύεται σταθερά

σε ένα μη πρωτεϊνικό συστατικό που περιλαμβάνεται στην κατάλυση, όπως για παράδειγμα, μία προσθετική ομάδα. Οι δραστηριότητες άλλων ενζύμων απαιτούν την παρουσία ενός συν-υποστρώματος που είναι αμφίδρομα συνδεδεμένο με το πρωτεϊνικό τμήμα (Belitz, 2006).

### 2.1.2 Ονοματολογία-ταξινόμηση των ενζύμων

Η Επιτροπή Ονοματολογίας της «Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας» (IUBMB) θέσπισε κανόνες για τη συστηματική ταξινόμηση και προσδιορισμό των ενζύμων με βάση την εξειδίκευση της αντίδρασης (Belitz, 2006).

Η πρώτη βασική αρχή είναι ότι τα ονόματα που έχουν την κατάληξη -άση πρέπει να χρησιμοποιούνται για μεμονωμένα ένζυμα και να μην αναφέρονται σε ενζυμικά συστήματα (Enzyme nomenclature, 1992).

Η δεύτερη βασική αρχή είναι ότι τα ένζυμα ονοματίζονται αρχικά με βάση την αντίδραση που καταλύουν. Η αντίδραση αυτή είναι η βασική ιδιότητα διαχωρισμού των ενζύμων (Enzyme nomenclature, 1992).

Η Τρίτη βασική αρχή είναι ότι τα ένζυμα κατατάσσονται σε ομάδες με βάση τον τύπο της αντίδρασης που καταλύουν. Αυτό, σε συνδυασμό με το όνομα του υποστρώματος αποτελεί τη βάση για την ονοματολογία των ενζύμων (Enzyme nomenclature, 1992).

Αποτέλεσμα της εφαρμογής των κανόνων αυτών είναι κάθε ένζυμο να έχει δύο ονομασίες, τη συστηματική και την κοινή. Τα συστηματικά ονόματα αποτελούνται από δύο μέρη. Το ένα είναι το όνομα του υποστρώματος και το άλλο μέρος, που φέρει την κατάληξη -άση, αναφέρεται στη φύση της αντίδρασης που καταλύεται από το συγκεκριμένο ένζυμο (Γεωργάτσος, 1991 ; Enzyme nomenclature, 1992). Η συστηματική ονοματολογία βασίζεται στους κανόνες που προαναφέρθηκαν και παρουσιάζει την ακριβή δράση του ενζύμου (Enzyme nomenclature, 1992).

Τα κοινά ονόματα μοιάζουν πολύ με τα συστηματικά, αλλά περιέχουν πολύ λιγότερη λεπτομέρεια καθώς και τις απολύτως απαραίτητες πληροφορίες για κάθε ένζυμο (Γεωργάτσος, 1991).

Τα ένζυμα κατατάσσονται σε έξι κατηγορίες ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που καταλύουν. Στην καθεμία από τις κύριες κατηγορίες υπάρχουν υποκατηγορίες που

περιλαμβάνουν ένζυμα τα οποία εκδηλώνουν την ίδια δράση αλλά σε υποστρώματα με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον η κάθε υποκατηγορία υποδιαιρείται σε διαφορετικές ομάδες, η καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει ένζυμα με κάποιο χαρακτηριστικό διαφορετικό ως προς τη δράση του (Γεωργάτσος, 1991).

Σε κάθε ομάδα το κάθε ένζυμο χαρακτηρίζεται από έναν αύξοντα αριθμό. Ο πρώτος αριθμός δηλώνει σε ποια από τις έξι κατηγορίες ανήκει το ένζυμο. Ο δεύτερος αριθμός δηλώνει την υποκατηγορία, ο τρίτος την υπο-υποκατηγορία και ο τέταρτος αριθμός είναι ο αριθμός της σειράς της υπο-υποκατηγορίας.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα ονοματολογίας ενζύμου είναι το EC 3.1.1.4 αφορά την φωσφολιπάση  $A_2$ , όπου ο πρώτος αριθμός «3» αναφέρεται στην κατηγορία των υδρολασών, ο δεύτερος αριθμός «1» (υποκατηγορία) δηλώνει την κατάλυση των εστερικών δεσμών, ο τρίτος αριθμός «1» (υπο-υποκατηγορία) δηλώνει ότι πρόκειται για υδρόλυση καρβοξυλεστέρα και τέλος ο τέταρτος αριθμός «4» δηλώνει τη σειρά της υπο-υποκατηγορίας (Belitz, 2006).

Οι έξι κύριες κατηγορίες που κατατάσσονται τα ένζυμα είναι οι εξής:

- **Οξειδοαναγωγάσες:** καταλύουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Το υπόστρωμα που οξειδώνεται είναι ο δότης υδρογόνου. Η συστηματική ονομασία βασίζεται στο όνομα του δότη. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι καταλάσες, οι οξειδάσες, οι δεϋδρογονάσες και οι υπεροξειδάσες (Belitz, 2006 ; Ηλιόπουλος, 1998).
- **Τρανσφεράσες:** καταλύουν την μεταφορά ορισμένων ομάδων από ένωση σε ένωση. Η συστηματική ονομασία γίνεται με βάση το σχήμα του δότη-αποδέκτη, ενώ η κοινή βασίζεται είτε στον δότη είτε στον αποδέκτη. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι τρανσφωσφορυλάσες, οι τρανσαμινάσες, οι τρανσαμιδάσες κ.α. (Belitz, 2006 ; Ηλιόπουλος, 1998).
- **Υδρολάσες:** καταλύουν τη διάσπαση χημικών δεσμών με την προσθήκη μορίων νερού. Οι δεσμοί που υδρολύονται είναι κυρίως δεσμοί C-N, C-O, O-P, O-S. Στις υδρολάσες ανήκουν οι φωσφατάσες, οι γλυκοζιτάσες, οι αμιδάσες και οι πρωτεάσες (Belitz, 2006 ; Ηλιόπουλος, 1998).

- Λυάσες: καταλύουν δεσμούς C-O, C-N και άλλους δεσμούς με απαλοιφή, αφήνοντας διπλούς δεσμούς ή δακτυλίους ή αντίθετα προσθέτοντας ομάδες σε διπλούς δεσμούς. Τέτοια ένζυμα είναι οι καρβοανυδράσες και οι αποκαρβοξυλάσες (Belitz, 2006 ; Ηλιόπουλος, 1998).
- Ισομεράσες: καταλύουν την μετατροπή διάφορων ενώσεων στα ισομερή τους. Ανάλογα με το είδος της ισομερίωσης διακρίνονται σε ρακεμάσες, επιμεράσες, ισομεράσες, ταυτομεράσες και κυκλομεράσες (Belitz, 2006 ; Ηλιόπουλος, 1998).
- Λιγάσες: καταλύουν τη σύνθεση ουσιών από πολλά μόρια με την προσφερόμενη ενέργεια του αδενοσινωτριφωσφορικού οφέος (ATP). Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η ακέτυλο-S-CoA καρβοξυλάση και η προπιόνυλο-S-CoA καρβοξυλάση (Belitz, 2006 ; Ηλιόπουλος, 1998).

### 2.1.3 Εξειδίκευση των ενζύμων

Με τον όρο εξειδίκευση εννοείται η ικανότητα ενός ενζύμου να καταλύει μία καθορισμένη ενζυμική αντίδραση και να διακρίνει το ιδανικό υπόστρωμα μεταξύ πολλών, που συναγωνίζονται για το ενεργό του κέντρο (Γεωργάτσος, 1991). Η εξειδίκευση αυτή αποδίδεται κυρίως στο χαρακτηριστικό ενεργό κέντρο του ενζύμου, στη δυνατότητα δημιουργίας συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος η οποία διακρίνεται σε τρία επίπεδα: την εξειδίκευση ομάδας, τη σχετική εξειδίκευση ομάδας και την απόλυτη εξειδίκευση ομάδας. Στην πρώτη περίπτωση, το ένζυμο δρα σε μία ομάδα υποστρωμάτων, στη δεύτερη, σε έναν αριθμό ομολόγων ενώσεων και στη τρίτη σε ένα μόνο υπόστρωμα (Belitz, 2006 & Royer, 1997).

Επίσης, η εξειδίκευση διακρίνεται σε απόλυτη, υψηλή και χαμηλή. Ένζυμα με απόλυτη εξειδίκευση είναι εκείνα που δρουν αποκλειστικά σε ένα μόνο υπόστρωμα, ένζυμα με υψηλή εξειδίκευση αλληλεπιδρούν με ένα μικρό αριθμό υποστρωμάτων, ενώ ένζυμα με χαμηλή εξειδίκευση είναι αυτά που μπορούν να καταλύσουν μια μεγάλη ποικιλία φωσφορικών και καρβοξυλικών εστέρων (Belitz, 2006).

### 2.1.4 Καταλυτική δράση-Ενεργό κέντρο

Η πιο σημαντική ιδιότητα των ενζύμων είναι η ικανότητά τους να καταλύουν τη μετατροπή ενώσεων σε προϊόντα αποτελεσματικά (Whitaker, 1993). Η μετατροπή αυτή γίνεται με τη μείωση

της ενέργειας ενεργοποίησης, η οποία είναι η ελάχιστη ενέργεια που απαιτείται για τη μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν (Whitaker, 1993).

Η καταλυτική δράση των ενζύμων δεν είναι κατανεμημένη ομοιόμορφα σε ολόκληρο το μόριό τους αλλά εντοπίζεται σε ορισμένες περιοχές του μορίου τους που ονομάζονται ενεργά κέντρα. Αυτά είναι δομικά στοιχεία των ενζύμων που καθορίζουν την εξειδίκευσή τους, τόσο ως προς το είδος της αντίδρασης όσο ως προς τη φύση του υποστρώματος (Ηλιόπουλος, 1998). Αποτελούνται από 10-15 αμινοξέα που έρχονται σε επαφή μεταξύ τους από διαφορετικά τμήματα της πεπτιδικής αλυσίδας (Whitaker, 1993). Ένα τμήμα του ενεργού κέντρου είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση του υποστρώματος, ενώ ένα άλλο τμήμα είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν (Wellner, 1997).

Σύμφωνα με τις στατικές θεωρίες, προτείνεται ένα πρότυπο όπου το ένζυμο εμφανίζει μία συγκεκριμένη και αμετάβλητη καταλυτική επιφάνεια. Το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος δημιουργείται μόνο εφόσον το υπόστρωμα μπορεί να προσαρμοστεί στην ενζυμική επιφάνεια (Γεωργάτσος, 1991).

Οι ημιστατικές θεωρίες στηρίζονται στην παραδοχή ότι η δέσμευση του υποστρώματος στο ένζυμο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία κάποιας «τάσης» ή «παραμόρφωσης» του δεσμού ή των δεσμών που πρόκειται να διασπαστούν, με συνεπακόλουθη αύξηση στην αστάθεια των δεσμών (Γεωργάτσος, 1991).

Οι δυναμικές θεωρίες αντιμετωπίζουν το ένζυμο και το υπόστρωμα σαν σύστημα του οποίου τα άτομα βρίσκονται σε συνεχείς θερμικές κινήσεις. Οι κινήσεις αυτές, δεν είναι τυχαίες, αλλά είναι χαρακτηριστικές και επαναλαμβανόμενες. Ακόμα, έχουν άμεση σχέση με τις δυνάμεις των δεσμών μέσα στα μόρια. Το υπόστρωμα δεσμεύεται με το ένζυμο, με αποτέλεσμα τη μείωση της εντροπίας (Γεωργάτσος, 1991).

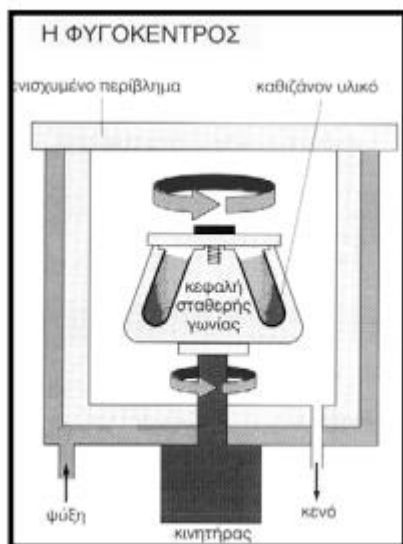
## **2.2 Διαχωρισμός των ενζύμων**

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη της δομής και του μηχανισμού δράσης των ενζύμων είναι η διάθεσή τους σε καθαρή μορφή. Για το λόγο αυτό, πρέπει το ένζυμο να εξαχθεί από τα κύτταρα ή τους ιστούς, στους οποίους βρίσκεται και στη συνέχεια να διαχωριστεί από πολλές πρωτεΐνες και άλλες ενώσεις που συνυπάρχουν στην ακατέργαστη μορφή του προς ανάλυση δείγματος (Lehninger, 1975; Stellwag, 1997).

### 2.2.1 Διαχωρισμός με φυγοκέντρωση

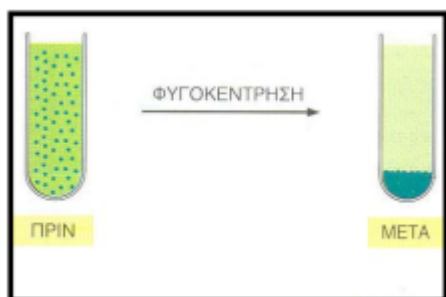
Η φυγοκέντρωση είναι μία τεχνική που βρίσκει σημαντικές εφαρμογές στο διαχωρισμό στερεής φάσης από υγρή σε μίγμα τους, ακόμη και υγρής φάσης από υγρή. Πλεονεκτεί έναντι της διήθησης ως προς την ταχύτητα και τη δυνατότητα ταυτόχρονου διαχωρισμού πολλών μιγμάτων.

Η φυγοκέντρωση επίσης συνέβαλλε σημαντικά στη γνώση που υπάρχει σήμερα για τα υποκυτταρικά στοιχεία. Είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη διαδικασία για το διαχωρισμό ενός ομογενοποιημένου κυττάρων σε διάφορα μέρη ή κλάσματα. Στη συνηθισμένη τους μορφή οι συσκευές φυγοκέντρωσης αποτελούνται από ένα μεταλλικό ρότορα (κεφαλή) με οπές όπου εισάγονται ειδικοί σωλήνες με το ομογενοποιημένο και από ένα κινητήριο περιστροφής. Το ομογενοποιημένο περιστρέφεται με μεγάλη ταχύτητα στη φυγόκεντρο και έτσι αναπτύσσονται τεράστιες δυνάμεις. Τα διάφορα στερεά κινούνται ανάλογα με το μέγεθος, την πυκνότητά τους και το ιξώδες του εκχυλίσματος στο οποίο βρίσκονται, προς την κατεύθυνση εφαρμογής της δύναμης. Η δύναμη αυτή, γνωστή ως φυγόκεντρος  $F$ , ισούται με το γινόμενο του τετραγώνου της γωνιακής ταχύτητας  $\omega$ , επί την ακτίνα περιστροφής  $r$  ( $F = \omega^2 * r$ ). Συνήθως γίνεται αναφορά στη σχετική φυγόκεντρο δύναμη  $\Phi$  που είναι αριθμός πολλαπλασίου της επιτάχυνσης της βαρύτητας  $g$ . Λόγω των μεγάλων ταχυτήτων που αναπτύσσει κάθε φυγόκεντρος, ο θάλαμος στον οποίο βρίσκεται πρέπει να ψύχεται και να διατηρείται σε κενό έτσι ώστε το ομογενοποιημένο να μη θερμαίνεται από τις τριβές. Η φυγόκεντρος περιβάλλεται από ένα παχύ προστατευτικό περίβλημα επειδή μία κεφαλή που δεν είναι καλά ισοζυγισμένη μπορεί να προκαλέσει παταγώδη έκρηξη. Τέλος πρέπει να σημειωθεί πως γενικά χρησιμοποιούνται είτε κεφαλές σταθερής γωνίας είτε κεφαλές με κινητούς βραχίονες. Στα σχήματα 1 και 2 ακολουθεί απεικόνιση της φυγοκέντρου και του αποτελέσματός της αντίστοιχα.



Σχήμα 1: Συσκευή φυγοκέντρισης

(Χουρζαμάνογλου, 2008)



Σχήμα 2: Αποτέλεσμα φυγοκέντρισης. Αριστερά:κυτταρικό ομογενοποίημα πριν από τη φυγοκέντρωση. Δεξιά: μετά τη φυγοκέντρωση είναι διαχωρισμένα το υπερκείμενο (ανοιχτό λαχανί) με τα μικρότερα και λιγότερο πυκνά συστατικά του αρχικού ομογενοποιημάτος και το ίζημα (σκούρο πράσινο) με τα μεγαλύτερα και πιο πυκνά συστατικά.

(Χουρζαμανόγλου, 2008)

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι συσκευών φυγοκέντρωσης. Ένας από αυτούς είναι οι αναλυτικές φυγόκεντροι, που χρησιμοποιούνται για μικρά δείγματα (της τάξης των ml) και ονομάζονται και υπερφυγόκεντροι επειδή μπορούν να φτάσουν σε μεγάλο αριθμό στροφών ανά λεπτό. Οι σημερινές υπερφυγόκεντροι περιστρέφονται με ταχύτητα έως και 100.000 στροφές ανά λεπτό και παράγουν δυνάμεις έως και 600.000 φορές μεγαλύτερες από τη βαρύτητα. Ο δεύτερος τύπος

είναι οι παρασκευαστικές φυγόκεντροι, οι οποίες λειτουργούν με μεγαλύτερα δείγματα (10–20.000 ml) και φτάνουν έναν περιορισμένο αριθμό στροφών ανά λεπτό.

## 2.2.2 Άλλες μέθοδοι διαχωρισμού

Στις μεθόδους διαχωρισμού ο αναλύτης και οι παρεμποδιστές μπορούν να διαχωριστούν εάν υπάρχει μία τουλάχιστον σημαντική διαφορά στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Στον πίνακα 1 δίνονται παραδείγματα μεθόδων διαχωρισμού ταξινομημένων με βάση την ιδιότητα η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση μεθόδων διαχωρισμού.

<b>Βάση διαχωρισμού</b>	<b>Μέγεθος διαχωρισμού</b>
Μέγεθος	Διήθηση–Διαπίδυση-Χρωματογραφία αποκλεισμού
Μάζα και Πυκνότητα	Φυγοκέντριση
Σχηματισμός συμπλόκου	Χημική αδρανοποίηση ή κάλυψη
Μεταβολή φυσικής κατάστασης	Απόσταξη – Ανακρυστάλλωση
Μεταβολή χημικής κατάστασης	Εναπόθεση - Ιονανταλλαγή - Ηλεκτραπόθεση - Εξάτμιση
Κατανομή μεταξύ φάσεων	Εκχύλιση - Χρωματογραφία

(Belitz, 2006)

## 2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική δραστηριότητα

### 2.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστηριότητα

Η θερμική επεξεργασία μπορεί είτε να επιταχύνει επιθυμητές χημικές ή ενζυμικές αντιδράσεις είτε να εμποδίσει ανεπιθύμητες μεταβολές με αδρανοποίηση των ενζύμων ή των



μικροοργανισμών. Ο πίνακας 2 αναφέρεται στην ποιοτική υποβάθμιση που προκαλείται από ένζυμα που μπορούν να εξαλειφθούν με θερμική αδρανοποίηση.

Πίνακας 2: Θερμική αδρανοποίηση ενζύμων για την παρέμποδιση της ποιοτικής υποβάθμισης τροφίμων.

ΠΡΟΙΟΝ	ΈΝΖΥΜΟ	ΑΠΩΛΕΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ
Προϊόντα πατάτας, μήλου	Οξειδάση της μονοφαινόλης	Ενζυμική αμαύρωση
Ημιώριμος αρακάς	Λιποξυγονάση, Υπεροξειδάση	Ελλατώματα αρώματος Αποχρωματισμός
Προϊόντα ιχθυερών	Πρωτεΐνάση, Θειαμινάση	Απώλεια βιταμίνης Β <sub>1</sub> , Υφή (ρευστοποίηση)
Τοματοπολτός	Πολυγαλακτουρονάση	Υφή (μείωση του ιξώδους)
Προϊόντα βερίκοκου	β-Γλυκοσιδάση	Χρωματικά ελλατώματα
Νιφάδες βρώμης	Λιπάση, Λιποφυγονάση	Ελλατώματα αρώματος (πικρή γεύση)
Μπρόκολο, κουνουπίδι	Συσταθειονίνη, β-Λυάση	Κακοσμία

(Belitz, 2006)

Όσο αφορά την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης, αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι ενός σημείου, το οποίο θεωρείται ως άριστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου. Πάνω από αυτό το σημείο η δράση του ενζύμου μειώνεται εξαιτίας της μετουσίωσής του (Lehninger, 1975).

Η εξάρτηση των ενζύμων από τη θερμοκρασία και η μελέτη αυτής, παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη φύση τους, καθώς και για την υποβάθμιση της ποιότητας που προκαλείται από ένζυμα τα οποία μπορούν να αδρανοποιηθούν με την επίδραση της θερμοκρασίας (Walmsley, 1996).

### 2.3.2 Επίδραση του pH στην ενζυμική δραστηριότητα

Τα ένζυμα εξαιτίας της πρωτεϊνικής τους φύσης, συμπεριφέρονται σαν ηλεκτρολύτες, δηλαδή, ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, κάποιες ομάδες τους φορτίζονται

θετικά και κάποιες άλλες αρνητικά. Παρά το γεγονός ότι η κατανομή των φορτίων στο μόριο του ενζύμου μεταβάλλεται συνεχώς με αντίστοιχες μεταβολές του pH, η καταλυτική δράση του ενζύμου παραμένει ανεπηρέαστη σε μεγάλο εύρος της κλίμακας pH και επηρεάζεται δραματικά σε άλλες. Από αυτό εξάγεται το συμπέρασμα ότι από το σύνολο των ιονιζόμενων ομάδων του ενζύμου, μόνο ένας αριθμός επηρεάζει τις καταλυτικές ιδιότητές του (Γεωργάτσος, 1991). Τα ένζυμα μπορούν να αποκτήσουν πολλές διαφορετικές ιονικές μορφές, μία εκ των οποίων θα τους προσδώσει την καταλυτική τους ιδιότητα και η οποία εξαρτάται από την τιμή του pH (Royer, 1997).

Η ευαισθησία των ενζύμων στις μεταβολές του pH οφείλεται στην αλλαγή της δομής του ενζύμου που οδηγεί σε μη αναστρέψιμη μετουσίωση και στην ποιότητα των ηλεκτρικών φορτίων του ενεργού κέντρου που μεταβάλλονται με ανάλογες διακυμάνσεις του pH (Belitz, 2006).

Το pH, εκτός από την επίδραση που έχει στον ιονισμό του μορίου του ενζύμου, επιδρά και στον ιονισμό του υποστρώματος, του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, των επιταχυντών και των αναστολέων (Lehninger, 1975).

Πολύ υψηλές ή πολύ χαμηλές τιμές pH είναι δυνατόν να προκαλέσουν τη μετουσίωση των ενζύμων, λόγω του ασταθούς χαρακτήρα τους (Whitaker, 1993). Για τα περισσότερα ένζυμα το άριστο pH βρίσκεται στην περιοχή 5,5-7,5. Αξίζει να σημειωθεί ότι το άριστο pH, είναι μία λειτουργική παράμετρος που εξαρτάται από τη φύση του υποστρώματος και του ρυθμιστικού διαλύματος, το χρόνο της αντίδρασης, τη θερμοκρασία και τη φύση του συμπαραγόντα (Whitaker, 1993 ; Lehninger, 1975).

Παρόλο που δεν είναι πάντα εφικτό οι πειραματικές αναλύσεις να γίνονται στο άριστο pH δράσης του ενζύμου, είναι πολύ σημαντικό το pH της αντίδρασης να διατηρείται σταθερό. Για το λόγο αυτό γίνεται χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων (Whitaker, 1993 ; Copeland, 1996 ; Lehninger, 1975). Επιπλέον, στο pH που θα επιλεγεί για την ανάλυση πρέπει το ένζυμο να παρουσιάζει σταθερή συμπεριφορά και να εμφανίζει ικανοποιητική δράση, έτσι ώστε ο προσδιορισμός του να αφορά τα πρώτα λεπτά της αντίδρασης.

### **2.3.3 Επίδραση του νερού στην ενζυμική δραστηριότητα**

Μέχρι ορισμένου βαθμού, τα ένζυμα πρέπει να ενυδατωθούν προκειμένου να αναπτύξουν δραστηριότητα. Για τη συντήρηση των τροφίμων είναι υποχρεωτικό να αναστέλλεται η ενζυμική

δραστικότητα εντελώς εάν η θερμοκρασία αποθήκευσης είναι κάτω από τη θερμοκρασία μετάπτωσης (Belitz, 2006).

#### **2.3.4 Επίδραση της πίεσης στην ενζυμική δραστικότητα**

Η εφαρμογή υψηλών πιέσεων μπορεί να αναστείλει την δραστικότητα των ενζύμων. Η υψηλή πίεση δεν προσβάλλει την πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών σε θερμοκρασία δωματίου. Διασπώνται μόνο Η-γέφυρες, ιοντικοί δεσμοί και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Οι τεταρτοταγείς δομές διαχωρίζονται σε υποομάδες χαμηλές πιέσεις (<150 MPa). Υψηλότερες πιέσεις (>1200 MPa) μεταβάλουν την τριτοταγή δομή και πολύ πιο υψηλές πιέσεις διασπούν τις Η-γέφυρες που σταθεροποιούν τη δευτεροταγή δομή. Η ενυδάτωση των πρωτεϊνών μεταβάλλεται επίσης με τη υψηλή πίεση επειδή τα μόρια του νερού πιέζονται μέσα σε κοιλότητες που μπορεί να βρίσκονται στο υδρόφοβο εσωτερικό των πρωτεϊνών. Γενικά, οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται αμετάκλητα σε θερμοκρασία δωματίου με την εφαρμογή πιέσεων >300 MPa, ενώ χαμηλότερες πιέσεις προκαλούν μόνο αμφίδρομες μεταβολές στην πρωτεϊνική δομή.

Ακόμα και μικρές μεταβολές στη στερεοχημική διευθέτηση και στη κινητικότητα των μορίων αμινοξέων που συμμετέχουν στη κατάλυση μπορούν να οδηγήσουν σε απώλεια δραστικότητας. Εντούτοις, συχνά απαιτείται σχετικά υψηλή πίεση για να ανασταλούν τα ένζυμα.

Είναι αξιοπρόσεκτο ότι τα ένζυμα μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν από μεταβολές στη διαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, οι οποίες αρχίζουν ειδικά κοντά σε χαμηλές πιέσεις περίπου 100 MPa. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής της πίεσης για την παραγωγή σταθερών τροφίμων, ο άθικτος ιστός και τα μη απομονωθέντα ένζυμα, εκτίθενται σε υψηλές πιέσεις. Κατά συνέπεια, η ενζυμική δραστικότητα μπορεί να αυξηθεί αντί να μειωθεί όταν κύτταρα ή μεμβράνες αποσυντίθενται με την απελευθέρωση του ενζύμου ή/και του υποστρώματος (Belitz, 2006).

#### **2.4 Επιταχυντές**

Επιταχυντής είναι ένωση ή ιόν το οποίο ενώνεται με το ένζυμο, με σκοπό να αυξήσει τη δραστικότητά του, δηλαδή την ταχύτητα αντίδρασης, χωρίς αυτό να υποστεί καμία μεταβολή (Belitz, 2006). Οι επιταχυντές χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, σε αυτούς οι οποίοι είναι απαραίτητοι για να προχωρήσει η ενζυμική αντίδραση και σε αυτούς οι οποίοι καταλύουν επίσης

την ενζυμική αντίδραση αλλά δεν είναι απαραίτητοι. Σημαντικοί ενζυμικοί επιταχυντές είναι τα ιόντα μετάλλων, όπως το  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  κ.α. (Γεωργάτσος, 1991).

## 2.5 Αναστολείς

Η καταλυτική δράση των ενζύμων επηρεάζεται από την παρουσία αναστολέων, ουσιών που μειώνουν τη δραστηριότητά τους. Η ανασταλτική δράση των ουσιών αυτών διακρίνεται σε αντιστρεπτή και μη αντιστρεπτή (Cornish-Bowden, 1995).

Η αντιστρεπτή μεταβολή διακρίνεται σε συναγωνιστική, μη συναγωνιστική και ανταγωνιστική.

Στην συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας μπορεί να ενωθεί με το ελεύθερο ένζυμο με τρόπο ώστε να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για τη δέσμευση του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Κατά την αντίδρασή τους σχηματίζεται ένα σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα ανάλογο με αυτό του ενζύμου-υποστρώματος. Το μόριο του αναστολέα δεν μεταβάλλεται χημικά (Belitz, 2006; Whitaker, 1993). Με μεγάλη αύξηση του υποστρώματος, αντιστρέφεται η δράση του αναστολέα και το ένζυμο σχηματίζει σύμπλοκο αποκλειστικά με το υπόστρωμα (Belitz, 2006).

Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας συνδέεται είτε με ελεύθερο ένζυμο είτε με σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Χαρακτηριστικό όμως είναι ότι ο αναστολέας ενώνεται όχι με το ενεργό κέντρο αλλά με άλλη περιοχή του ενζύμου και το καταστρέφει. Έτσι, δεν σχηματίζεται σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και δεν υπάρχει παραγωγή προϊόντος (Belitz, 2006 ; Γεωργάτσος, 1991; Cornish-Bowden, 1995).

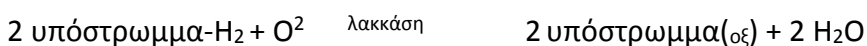
Στην ανταγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας δεσμεύεται αποκλειστικά με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και έτσι σχηματίζεται σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος-αναστολέα με αποτέλεσμα την αδυναμία σχηματισμού προϊόντος (Belitz, 2006; Γεωργάτσος, 1991; Cornish-Bowden, 1995).

Στην μη αντιστρεπτή αναστολή ο αναστολέας ενώνεται με μία χαρακτηριστική ομάδα του ενζύμου, η οποία είναι υπεύθυνη για την καταλυτική του δράση, οπότε το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα που δημιουργείται δεν διασπάται. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα ανάλογα με τη φύση τους αναστέλλονται από διάφορους αναστολείς (Belitz, 2006 ; Lehninger, 1975 ; Whitaker, 1993).

## 2.6 Λακκάση

Η λακκάση (p-διφαινύλο-οξειδορεδουκτάση, EC1.10.3.2) ανήκει στις πολύ-χαλκούχες πολυφαινολικές οξειδάσες και παράγονται κυρίως από βασιδιομύκητες αλλά και από μερικά στελέχη ασκομυκήτων. Η λακκάση ως ένζυμο παρουσιάζει υψηλή θερμική αντοχή και είναι το κύριο ένζυμο που καταλύει την οξείδωση πολλών οργανικών αρωματικών υποστρωμάτων, κυρίως φαινολικά συστατικά και διαμίνες, αλλά δεν οξειδώνει την τυροσίνη (Thurston, 1994; Minussi et al. 2002). Υποστρώματα της λακκάσης είναι διάφορες ο- και p-διφαινόλες, πολυφαινόλες, αμινοφαινόλες, αρυλοδιαμίνες και πολυαμίνες καθώς και η λιγνίνη. Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών και των υδρόξυ ομάδων της λιγνίνης από το ένζυμο λακκάση πραγματοποιείται με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου και το σχηματισμό ριζών, οι οποίες δύναται να πολυμεριστούν ή να οδηγήσουν σε αποπολυμερισμό (Thurston, 1994 ; Minussi et al. 2002). Η λακκάση περιλαμβάνει στη δομή της τέσσερα ενεργά κέντρα, το καθένα από τα οποία περιέχει ένα ιόν χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Τα τέσσερα ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$  κατανέμονται σε διαφορετικές θέσεις και ταξινομούνται σε τρεις τύπους, T1, T2 και T3. Ο τύπος χαλκού T1 εμπλέκεται στην πρόσληψη και μεταφορά ηλεκτρονίων, ο τύπος T2 ενεργοποιεί το μοριακό οξυγόνο, ενώ ο τύπος T3 (που αποτελείται από 2 ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$ ) είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του οξυγόνου (Palmer et al. 2001).

Στα ενεργά αυτά κέντρα πραγματοποιείται οξείδωση των φαινολικών συστατικών (τυπικά υποστρώματα δράσης του ενζύμου) μέσω μιας εξωτερικής μεταφοράς ηλεκτρονίων και αντίστοιχη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό σχετίζεται με τη μετατροπή του υποστρώματος και πιο συγκεκριμένα με οξείδωση των φαινολικών συστατικών. Χαρακτηριστικά η αντίδραση της οξείδωσης:



Όσο αφορά τη δράση της λακκάσης, ένα φαινολικό συστατικό υφίσταται οξείδωση (απομακρύνοντας ένα ηλεκτρόνιο), σχηματίζοντας σε πρώτη φάση μια φαινοξυ-ρίζα, η οποία μετέπειτα έχει τη δυνατότητα είτε να μετασχηματιστεί σε κινόνη ή να προκαλέσει τον πολυμερισμό της ενδιάμεσης αυτής ρίζας (Minussi et al. 2002).

Το δυναμικό οξειδοαναγωγής που παρουσιάζει το ένζυμο λακκάση εξαρτάται από την γενετική διαφοροποίηση των ειδών μυκήτων που την παράγουν. Ο μικρός αριθμός ουσιών που την αναστέλλουν και η υψηλή οξειδωτική δράση της (10-100 φορές μεγαλύτερη από τη δράση των

ενζύμων λιγνίνη, υπεροξειδάση ή Mn-υπεροξειδάση), καθιστούν τη λακκάση ιδανικό ένζυμο για την αποδόμηση κυρίως φαινολικών και άλλων αρωματικών συστατικών (Belitz, 2006). Το υψηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής της λακκάσης λειτουργεί ανασταλτικά για την οξείδωση μη-φαινολικών υποστρωμάτων.

Οι λακκάσες είναι ικανές να οξειδώνουν και συστατικά που έχουν οξειδοαναγωγικά δυναμικά υπεράνω του ενζύμου, παρουσία βέβαια εξειδικευμένων ενεργοποιητών (διαμεσολαβητών-σύστημα λακκάση-διαμεσολαβητή/σύστημα LM). Οι διεργασίες των LM συστημάτων είναι αποδοτικές, επαναλήψιμες, με εφαρμογή τους στην αποτοξικοποίηση διαφόρων υγρών αποβλήτων ξύλου καθώς και στην οξείδωση των μη-φαινολικών υπομονάδων της λιγνίνης. Η φτωχή λιγνινολυτική δράση του ενζύμου λακκάση, έχει τη δυνατότητα να βελτιωθεί αισθητά με την προσθήκη ενεργοποιητών όπως αζωτούχες ενώσεις που φέρουν υδρόξυ ομάδες, π.χ. με προσθήκη 1-ύδροξυ-βένζο-τριαζόλη (HBT 1-hydroxybenzotriazol). Το ένζυμο λακκάση παρουσία HBT, μπορεί να σχηματίσει οξυβενζοτριαζολική ρίζα, μια σταθερή ρίζα που οξειδώνει τόσο φαινολικά συστατικά όσο και λιγνίνη. Συγκεκριμένα, το σύστημα λακκάση-HBT σε αντίθεση με τη μεμονωμένη δράση του ενζύμου λακκάση όπου πραγματοποιείται μεταφορά ηλεκτρονίων, έχει την ικανότητα να αντιδρά με τη λιγνίνη μέσω ενός μηχανισμού ριζών, που προκύπτουν από την αφαίρεση ατόμων υδρογόνου από τον αρωματικό δακτύλιο (Belitz, 2006). Επίσης, σε πειράματα με βανιλική αλκοόλη μελετήθηκε ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου λακκάση παρουσία ή μη HBT. Διαπιστώθηκε ότι η απολιγνινοποίηση αρωματικών συστατικών που παρατηρείται από τη δράση του συστήματος λακκάση-HBT, οφείλεται κυρίως στην ικανότητα του να οξειδώνει διάφορες παράπλευρες, ως προς τον αρωματικό δακτύλιο υποομάδες (κυρίως άλκυλο ή καρβόξυ ομάδες), ακολουθούμενο από προσθήκη οξυγόνου στον αρωματικό δακτύλιο.

## 2.7 Υπεροξειδάση

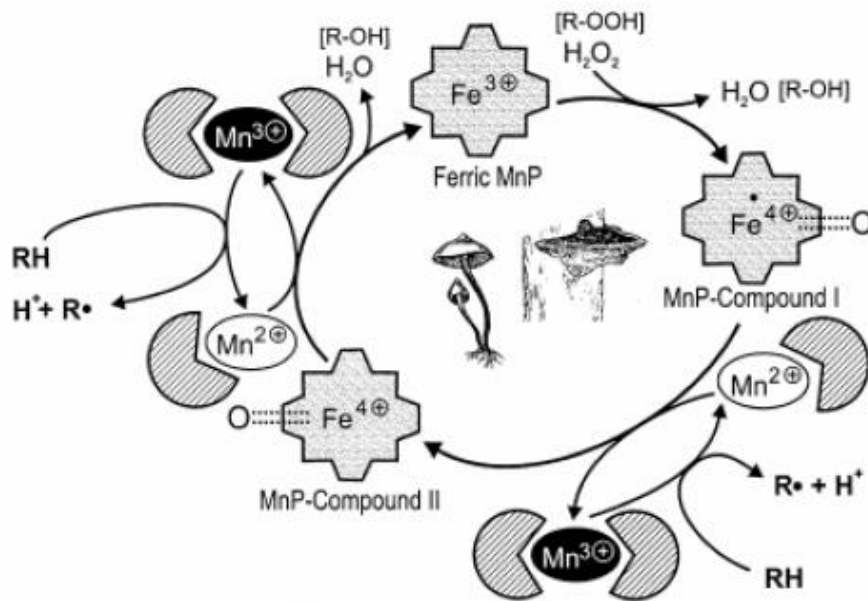
Οι υπεροξειδάσες είναι μία από τις μεγαλύτερες σειρές ενζύμων που δρουν ως καταλύτες για να επιτρέψουν μία ποικιλία βιολογικών διεργασιών να λάβει χώρα. Συγκεκριμένα, προωθούν την οξείδωση διάφορων ενώσεων χρησιμοποιώντας φυσικώς απαντώμενα υπεροξείδια, ιδιαίτερα το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), που μειώνονται, σχηματίζοντας νερό. Υπεροξείδια δημιουργούνται ως παραπροϊόντα βιοχημικών αντιδράσεων στο εσωτερικό των οργανισμών, αλλά μπορούν να προκαλέσουν βλάβη, καθώς είναι οξειδωτικοί παράγοντες. Οι υπεροξειδάσες διασπούν αυτές τις ουσίες σε αβλαβείς ουσίες με την προσθήκη μορίου υδρογόνου που

λαμβάνεται από έναν δότη μορίου, με μείωση του δυναμικού οξειδοαναγωγής, αντίδραση κατά την οποία το υπεροξείδιο ανάγεται για να σχηματίσει νερό και το άλλο μόριο είναι οξειδωμένο.

Η υπεροξειδάση υπάρχει σε μορφή εξαρτημένη από μαγγάνιο (Mn-Υπεροξειδάση) και μη εξαρτημένη από μαγγάνιο.

Το ένζυμο Mn-υπεροξειδάση δρα σε φαινολικά συστατικά και στις φαινολικές δομές της λιγνίνης που αντιπροσωπεύουν περίπου το 10% της λιγνίνης (Belitz, 2006). Κατά την 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 εξαρτημένη από το Mn(II), καθώς παρουσία Mn(II) είναι εφικτή η πραγμάτωση δύο διαδοχικών αναγωγών, πρώτα του συστατικού I σε ένα συστατικό, γνωστό στη βιβλιογραφία ως συστατικό II, και έπειτα πάλι σε ένζυμο σιδήρου. Επιπλέον, η προσθήκη ενώσεων ικανών να σχηματίσουν σύμπλοκα, όπως τα οξαλικά και τα γαλακτικά ιόντα διευκολύνουν την οξείδωση του Mn(II) (Belitz, 2006). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, κάτω από προϋποθέσεις, μπορεί να αντιδράσει με το συστατικό II της Mn-υπεροξειδάσης, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα υπερόξυ σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου γνωστό και ως συστατικό III. Επιπλέον, οξείδωση του συστατικού III από το υπεροξείδιο του υδρογόνου προκαλεί την απενεργοποίηση της Mn-υπεροξειδάσης. Αντιθέτως, ακολουθώντας άλλη πορεία, το συστατικό III (που αποτελεί ένα απενεργοποιημένο καταλυτικά σύμπλοκο) μπορεί να επανασχηματίσει το αρχικό σιδηρούχο ένζυμο, είτε με προσθήκη τριών ηλεκτρονίων ή με απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου (Banci et al., 1999). Το σύμπλοκο Mn(III)-οξαλικό είναι αρκετά σταθερό και είναι ικανό να οξειδώνει διάφορα φαινολικά συστατικά που έχουν χαμηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής από το σύμπλοκο Mn(II)-οξαλικό (Banci et al., 1999).

Στο σχήμα 3 παρουσιάζεται ο μηχανισμός δράσης ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου Mn-Υπεροξειδάση.



Σχήμα 3: Μηχανισμός δράσης του ενζύμου Mn- Υπεροξειδάση (Banci et al., 1999)

### 3 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της μεταβολής της απορρόφησης των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάσης κατά την ανάπτυξη καλλιέργειας μανιταριών ποικιλίας *Pleurotus*, καθώς και η επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και η προσθήκη διάφορων ουσιών στη μεταβολή της απορρόφησης του ενζύμου λακκάση.

## 4 Πειραματικά δεδομένα

### 4.1 Υλικά και όργανα

#### 4.1.1 Μανιτάρια *Pleurotus* (εμπορίου)

Τα πειράματα για τη δοκιμή των επιταχυντών και των αναστολέων έγιναν με δείγματα, εισαγόμενων από την Πολωνία, μανιταριών ποικιλίας *Pleurotus*. Επίσης, μελετήθηκε με τα



συγκεκριμένα δείγματα η διάρκεια δράσης της λακκάσης και της υπεροξειδάσης (εξαρτημένης και μη Mn). Τέλος, προσδιορίστηκε η άριστη θερμοκρασία και pH δράσης της λακκάσης.

#### 4.1.2 Καλλιέργεια μανιταριών *Pleurotus*

Καλλιέργεια μανιταριών *Pleurotus* αναπτύχθηκε σε θάλαμο με συνθήκες 90 % υγρασία και 17-19 ° C. Έπειτα χρησιμοποιώντας δείγμα από την συγκεκριμένη καλλιέργεια μελετήθηκε η δραστικότητα των ενζύμων λακκάση και υπεροξειδάση (εξαρτημένης και μη Mn).

#### 4.1.3 Αντιδραστήρια

- ενζυμικό εκχύλισμα μανιταριών
- οξικό νάτριο 50 mM
- ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) 1 mM
- διαλύμα ηλεκτρικού-γαλακτικού 0,1 M
- διαλύμα DMAB (3- dimethylaminobenzoic acid) 25 mM
- διαλύμα MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazonhydrochloride) 1 mM
- διαλύμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (υπεροξείδιο του υδρογόνου) 10 mM
- διαλύματος MnSO<sub>4</sub> (θειικό μαγγάνιο) 20 mM
- MgCl<sub>2</sub> (χλωριούχο μαγνήσιο) 1 mM
- CaCl<sub>2</sub> (χλωριούχο ασβέστιο) 1 mM
- CoCl<sub>2</sub> (χλωριούχο κοβάλτιο) 1 mM
- CuCl<sub>2</sub> (χλωριούχος χαλκός) 1 mM
- C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>INO<sub>3</sub> (νιτρικό 2,ιωδοαιθύλιο) 1 mM
- AgNO<sub>3</sub> (νιτρικός άργυρος) 1 mM

- $\text{NaN}_3$  (αζίδιο του νατρίου) 1 mM ,  $\text{NaN}_3$  10 mM
- $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$  (1,4-βενζοκινόνη) 1 mM
- DTT (Διθειοθρεϊτόλη) 1 mM , DTT 10 mM
- KCl (χλωριούχο κάλιο) 1 mM
- $\text{NH}_4\text{Cl}$  (χλωριούχο αμμώνιο) 1 mM

#### 4.1.4 Όργανα

- φυγόκεντρος Sorvall RC28S, Sorvall, Newton, CT, USA
- φασματοφωτόμετρο Helios γ, Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA
- υδατόλουτρο
- αναλυτικός ζυγός

## 4.2 Μέτρηση απορρόφησης των ενζύμων

### 4.2.1 Μέτρηση απορρόφησης του ενζύμου λακκάση (υλικά και μέθοδος).

Για τον προσδιορισμό της απορρόφησης του ενζύμου λακκάση τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα 0,2 ml δείγματος ενζύμου και 1,6 ml οξικό νάτριο συγκέντρωσης 50 mM (pH 4,5). Η εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0,2 ml ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) συγκεντρώσεως 1 mM. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στα 420 nm σε φασματοφωτόμετρο σε χρόνο 0 sec και 1 min από την είσοδο της κυψελίδας στο όργανο.

#### **4.2.2 Μέτρηση απορρόφησης του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn) (υλικά και μέθοδος).**

Ο προσδιορισμός της απορρόφησης του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn) πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού-γαλακτικού (pH 4,5) συγκεντρώσεως 0,1 M, 0,2 ml διαλύματος DMAB (3- dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM, 0,1 ml διαλύματος MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazonhydrochloride) συγκεντρώσεως 1 mM και 0,66 ml δείγμα ενζύμου. Ακολούθησε προσθήκη 0,01 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) συγκεντρώσεως 10 mM, και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας.

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm σε φασματοφωτόμετρο σε χρόνο 0 sec και 10 min, καθώς και στους ενδιάμεσους χρόνους ανά λεπτό, από την είσοδο της κυψελίδας στο όργανο.

#### **4.2.3. Μέτρηση απορρόφησης του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση (υλικά και μέθοδος).**

Ο προσδιορισμός της απορρόφησης του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού-γαλακτικού (pH 4,5) συγκεντρώσεως 0,1 M, 0,2 ml διαλύματος DMAB (3-dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM, 0,1 ml διαλύματος MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochloride) συγκεντρώσεως 1 mM, 0,66 ml δείγματος ενζύμου και 0,01 ml διαλύματος MnSO<sub>4</sub> συγκέντρωσης 20 mM. Ακολούθησε προσθήκη 0,01 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) συγκεντρώσεως 10 mM, και ανάδευση αυτού με το περιεχόμενο της κυψελίδας.

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm σε φασματοφωτόμετρο σε χρόνο 0 sec και 10 min, καθώς και στους ενδιάμεσους χρόνους ανά λεπτό, από την είσοδο της κυψελίδας στο όργανο.

#### **4.2.4 Προσδιορισμός επιταχυντών και αναστολέων του ενζύμου λακκάση**

Ακολουθείται η ίδια μέθοδος που περιγράφηκε παραπάνω στη παράγραφο 2.8.1 με τη μόνη διαφορά της προσθήκης της εκάστοτε ουσίας σε ποσότητα 0.2 mL.

#### **4.3 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας επώασης στην απορρόφηση της λακκάσης, σε μανιτάρια *Pleurotus* εμπορίου.**

Από συσκευασία μανιταριών *Pleurotus* συλλέχθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα (20%) και ακολουθώντας τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω μετρήθηκε η απορρόφηση στα 420 nm. Το δείγμα επώαστηκε για 20 min στην εκάστοτε θερμοκρασία

#### **4.4 Μελέτη της επίδρασης του pH στην απορρόφηση της λακκάσης σε μανιτάρια *Pleurotus* εμπορίου.**

Με παρόμοια διαδικασία, που αναφέρεται στη παράγραφο 4.2, αυτή τη φορά σταθεροποιώντας τη θερμοκρασία επώασης στους 40° C για 20 min, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 420 nm. Αυτό που άλλαζε ήταν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος.

#### **4.5 Μελέτη επίδρασης επιταχυντών και αναστολέων στην απορρόφηση της λακκάσης σε μανιτάρια *Pleurotus* εμπορίου**

Και αυτή τη φορά με χρόνο επώασης του δείγματος στους 40° C για 20 min και τιμή pH του ρυθμιστικού 5, ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω (παράγραφος 4.2), προσθέτοντας αυτή τη φορά μία ουσία σε κάθε δοκιμή. Μετρώντας την απορρόφηση στα 420 nm προσδιορίζεται η κάθε ουσία ως επιταχυντής ή αναστολέας της δράσης του ενζύμου λακκάση

#### **4.6 Μελέτη του χρόνου στην απορρόφηση της λακκάσης σε μανιτάρια *Pleurotus* εμπορίου**

Επίσης ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος (παράγραφος 4.2) και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 420 nm κατά τη διάρκεια επτά εβδομάδων με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του χρόνου στην ενζυμική δραστηριότητα της λακκάσης.

#### 4.7 Μελέτη του χρόνου στην απορρόφηση της υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης Mn και της Mn-υπεροξειδάσης σε μανιτάρια Pleurotus εμπορίου

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (στις παραγράφους 2.8.2 και 2.8.3) κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία συλλέγεται ενζυμικό εκχύλισμα μανιταριών Pleurotus και μετράται η ενζυμική δραστηριότητα στα 520 nm κατά τη διάρκεια επτά εβδομάδων.

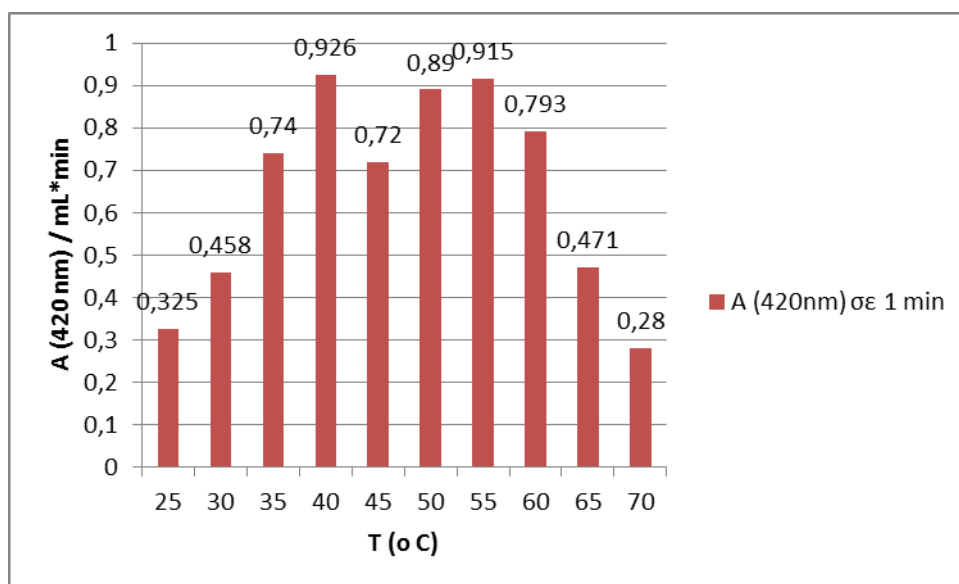
#### 4.8 Μελέτη της απορρόφησης των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάση κατά την ανάπτυξη καλλιέργειας μανιταριών Pleurotus

Οι τις ίδιες διαδικασίες για τον προσδιορισμό της δράσης των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάση που αναφέρθηκαν παραπάνω για μανιτάρια ποικιλίας Pleurotus του εμπορίου γίνονται και τώρα.

### 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ

#### 5.1 Άριστη θερμοκρασία επώασης

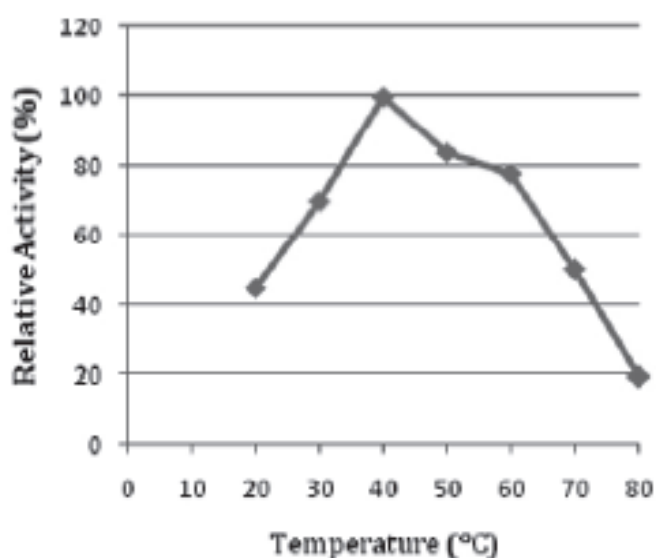
Στο σχήμα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστηριότητα της λακκάσης.



Σχήμα 4 : Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστηριότητα της λακκάσης.

Παρατηρείται πως με αύξηση της θερμοκρασίας επώασης αυξάνεται η τιμή απορρόφησης του ενζύμου λακκάση και έχει μέγιστη τιμή απορρόφησης στους 40° C. Στη συνέχεια, επιπλέον αύξηση της θερμοκρασίας επώασης προκαλεί μείωση της ενζυμικής απορρόφησης, αλλά στους 55° C πλησιάζει τη μέγιστη. Με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας να προκαλεί μείωση της απορρόφησης του ενζύμου λακκάση εξαιτίας της μετουσίωσης που λαμβάνει χώρα πέρα της συγκεκριμένης θερμοκρασίας.

Με παρόμοιο τρόπο συλλογής του ενζύμου λακκάση (φυγοκέντριση) και ίδιο υπόστρωμα (ABTS) αλλά από καλλιέργεια βύνης αντί μανιταριών παρατηρήθηκε πως η μέγιστη δραστηριότητα επιτυγχάνεται στους 40° C. Αυτό φαίνεται στο σχήμα 5.



(Muhammad et al., 2012).

Σχήμα 5 : Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα του ενζύμου λακκάση.

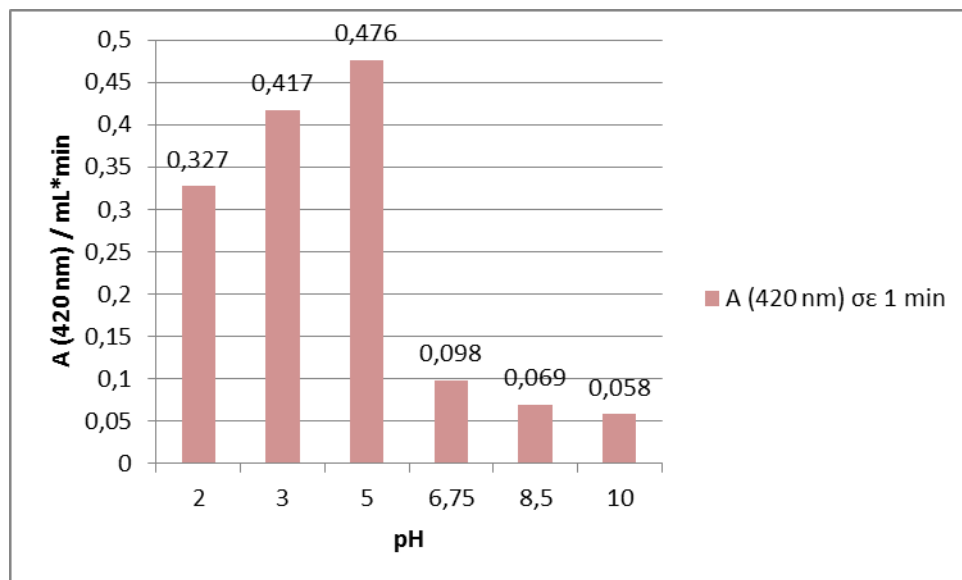
Μετά τους 40° C , θερμοκρασία βέλτιστης δράσης του ενζύμου, ξεκινάει η μετουσίωση της πρωτεϊνικής φύσης του ενζύμου και η αποσταθεροποίησή του με αλλαγή της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής και αλλοδόμισή του.

Σε αντίθεση με το ενζυμικό εκχύλισμα βύνης, αυτό της καλλιέργειας μανιταριών κάνει δεύτερη κορυφή στους 55° C, το οποίο πιθανόν οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα. Παρόλα αυτά και στις δύο περιπτώσεις φαίνεται ξεκάθαρα πως από τους 60° C και μετά η πτώση της ενζυμικής

δραστηκότητας είναι πιο έντονη απ' ότι στο διάστημα μεταξύ 40° C και 60° C, καθώς επίσης και το σημείο άριστης ενζυμικής δραστηκότητας είναι 40° C.

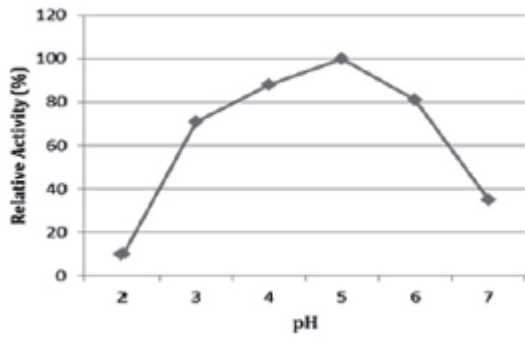
## 5.2 Άριστο pH

Οι τιμές στο σχήμα 6 δείχνουν την επίδραση του pH στην ενζυμική απορρόφηση της λακκάσης.



Σχήμα 6 : Επίδραση του pH στην ενζυμική απορρόφηση της λακκάσης

Παρατηρείται πως με αύξηση του pH αυξάνεται η ενζυμική απορρόφηση της λακκάσης με μέγιστη στην τιμή pH 5. Περαιτέρω αύξηση της τιμής του pH προκαλεί κατακόρυφη μείωση της ενζυμικής απορρόφησης. Με το ίδιο υπόστρωμα (ABTS) από ενζυμικό εκχύλισμα λακκάσης από βύνη παρουσιάστηκαν σχεδόν ίδια αποτελέσματα με τιμή pH 5 άριστης ενζυμικής δραστηκότητας και περαιτέρω αύξηση της τιμής pH να προκαλεί κατακόρυφη μείωση της ενζυμικής δραστηκότητας εξαιτίας της μετουσίωσης της πρωτεϊνικής φύσης του ενζύμου. Χαρακτηριστικά στο σχήμα 7 φαίνονται τα παραπάνω.



(Muhammad et al., 2012).

Σχήμα 7 : Επίδραση του pH στην δραστικότητα του ενζύμου λακκάση.

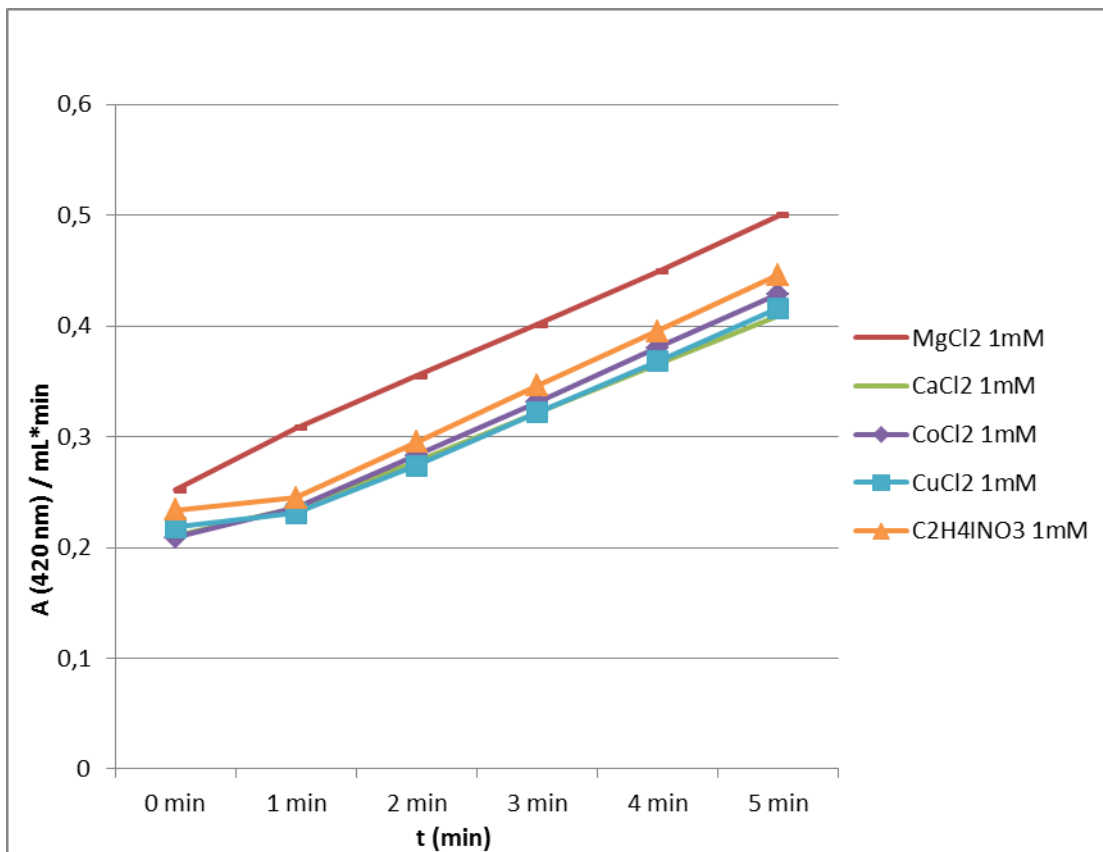
Και στις δύο καλλιέργειες, βύνης και μανιταριών, η πιο έντονη αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας παρατηρείται από την τιμή pH 6 και μετά.

### 5.3 Επιταχυντές και αναστολείς

Οι ουσίες  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $C_2H_4INO_3$ ,  $AgNO_3$ ,  $NaN_3$ ,  $C_6H_4O_2$ , DTT, KCl και  $NH_4Cl$  μελετούνται ως προς την επίδρασή τους στην ενζυμική απορρόφηση με σκοπό να χαρακτηριστούν ως επιταχυντές ή αναστολείς της δράσης του ενζύμου λακκάση.

Στο σχήμα 8 παρουσιάζεται η επίδραση των επιταχυντών στην ενζυμική απορρόφηση της λακκάσης σε μανιτάρια *Pleurotus* εμπορίου.

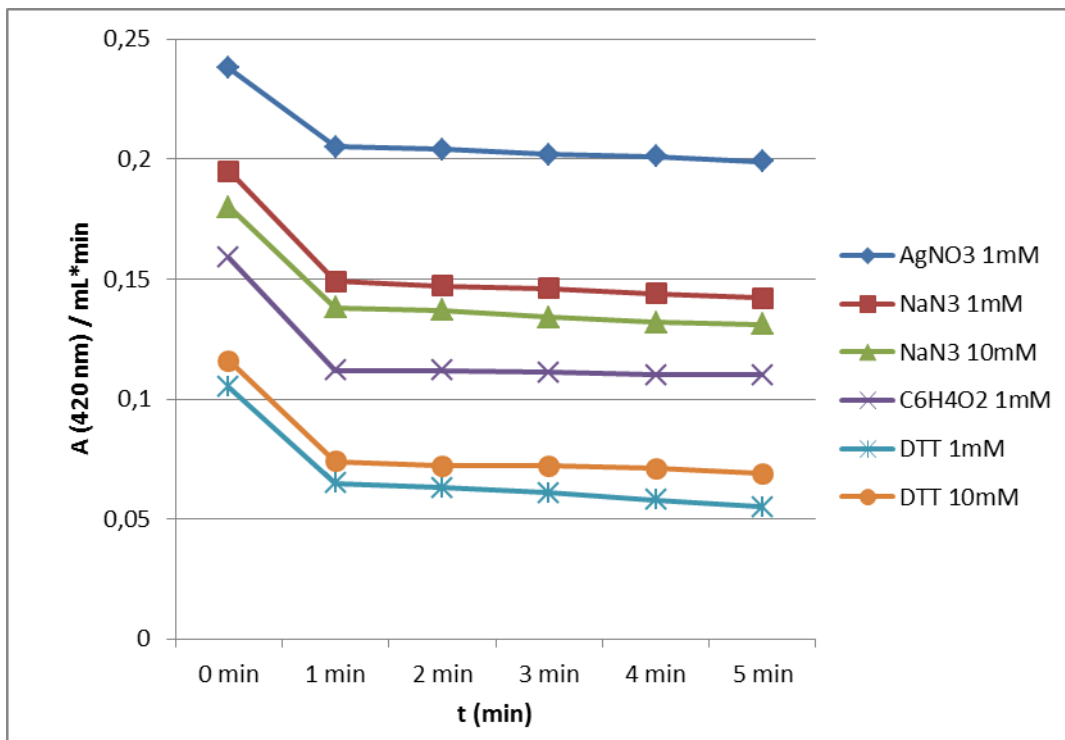




Σχήμα 8 : Επίδραση των επιταχυντών στην ενζυμική απορρόφηση της λακκάσης σε μανιτάρια *Pleurotus* εμπορίου.

Επιταχυντές της ενζυμικής δραστηριότητας της λακκάσης είναι το  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $C_2H_4INO_3$ , εξαιτίας της ιδιότητας των μεταλλικών ιόντων να συμπεριφέρονται ως επιταχυντές της ενζυμικής δράσης καθώς πραγματοποιείται οξείδωση των φαινολικών συστατικών στα ενεργά κέντρα του ενζύμου μέσω μιας εξωτερικής μεταφοράς ηλεκτρονίων και αντίστοιχη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό σχετίζεται με τη μετατροπή του υποστρώματος και πιο συγκεκριμένα με οξείδωση των φαινολικών συστατικών.

Στο σχήμα 9 παρουσιάζεται η επίδραση των αναστολέων στην ενζυμική απορρόφηση της λακκάσης σε μανιτάρια *Pleurotus* εμπορίου.



Σχήμα 9 : Επίδραση των αναστολέων στην ενζυμική απορρόφηση της λακκάσης σε μανιτάρια *Pleurotus* εμπορίου.

Ουσίες όπως  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$ , DTT λειτουργούν ως αναστολείς της δραστηριότητας του ενζύμου.

Οι ουσίες  $\text{KCl}$  και  $\text{NH}_4\text{Cl}$  αφήνουν ανεπηρέαστη την ενζυμική δραστηριότητα.

Σε παρόμοια διεργασία και παρασκευή ενζύμου (εκχύλισμα βύνης και συμπλήρωση με ABTS, έπειτα παρασκευή ενζύμου λακκάση με φυγοκέντριση) η προσθήκη ουσιών ως επιταχυντές ή αναστολείς παρουσίασε όμοια αποτελέσματα. Χαρακτηριστικά στους πίνακες 3 και 4 παρουσιάζεται η επίδραση της προσθήκης μεταλλικών ιόντων και άλλων ουσιών στη δραστηριότητα του ενζύμου λακκάση.

Πίνακας 3 : Επίδραση της προσθήκης μεταλλικών ιόντων στη δραστηριότητα του ενζύμου λακκάση.

ΜΕΤΑΛΛΙΚΑ ΙΟΝΤΑ (mmol/L)	ΣΧΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ (%)
ΛΕΥΚΟ	100
KCl	95

MgCl <sub>2</sub>	109
CuCl <sub>2</sub>	119
NH <sub>4</sub> Cl	89
NiCl <sub>2</sub>	50
CaCl <sub>2</sub>	90
AgNO <sub>3</sub>	58
BaCl <sub>2</sub>	54

(Muhammad et al., 2012).

Πίνακας 4 : Επίδραση της προσθήκης ουσιών στη δραστικότητα του ενζύμου λακκάση.

ΟΥΣΙΕΣ (mmol/L)	ΣΧΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ (%)
ΛΕΥΚΟ	100
DTT	20
NaN <sub>3</sub>	6

(Muhammad et al., 2012).

Παρατηρείται πως τα ιόντα Cu<sup>2+</sup> και Mg<sup>2+</sup> αυξάνουν την ενζυμική δραστικότητα και οι ουσίες DTT και NaN<sub>3</sub> τη μειώνουν.

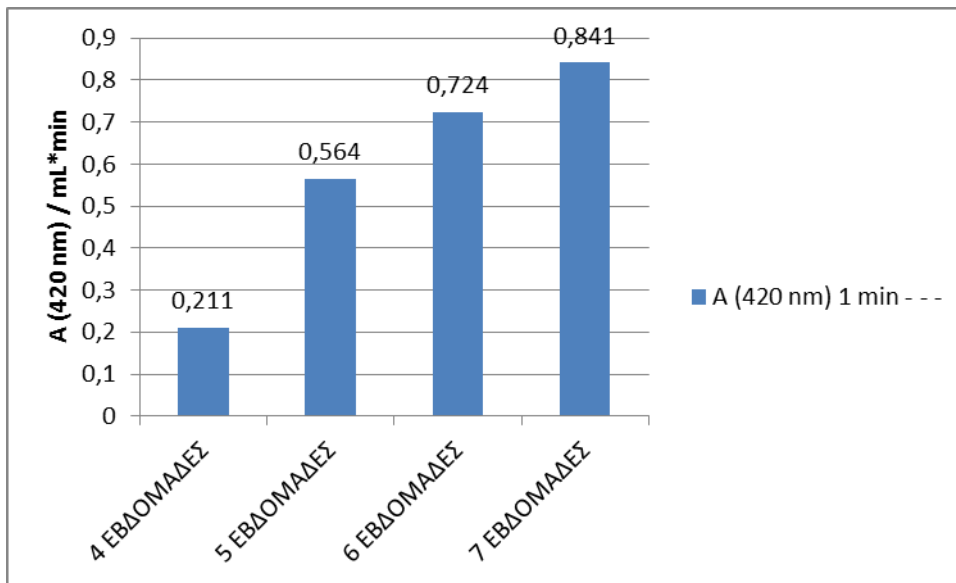
## 5.4 Χρόνος καλλιέργειας

### 5.4.1 Καλλιέργεια μανιταριών *Pleurotus*.

Ο χρόνος καλλιέργειας των μανιταριών επηρεάζει την απορρόφηση των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης Mn και της Mn-υπεροξειδάσης. Η αύξηση του χρόνου

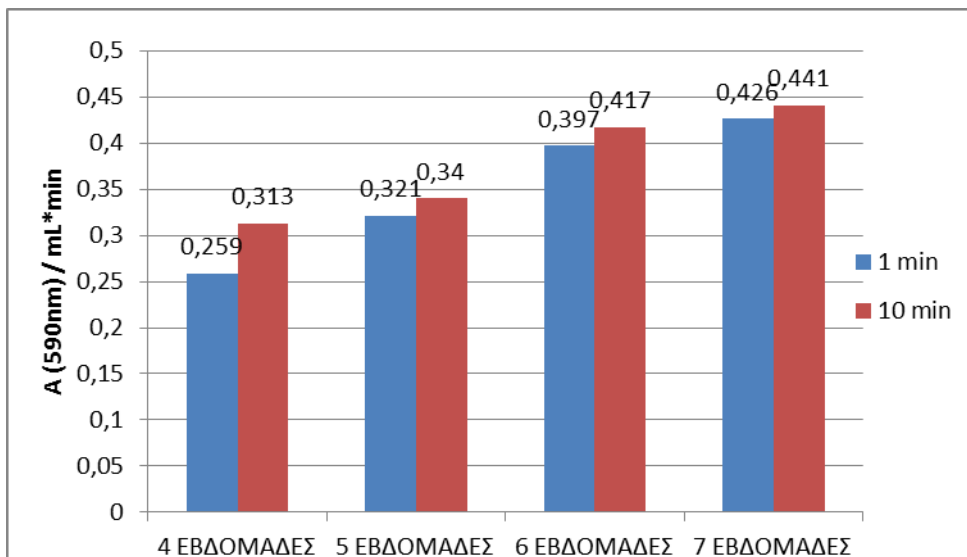
καλλιέργειας συνοδεύεται με αύξηση της απορρόφησης των ενζύμων.  
της ενζυμικής τους απορρόφησης στα παρακάτω σχήματα.

Τα αποτελέσματα



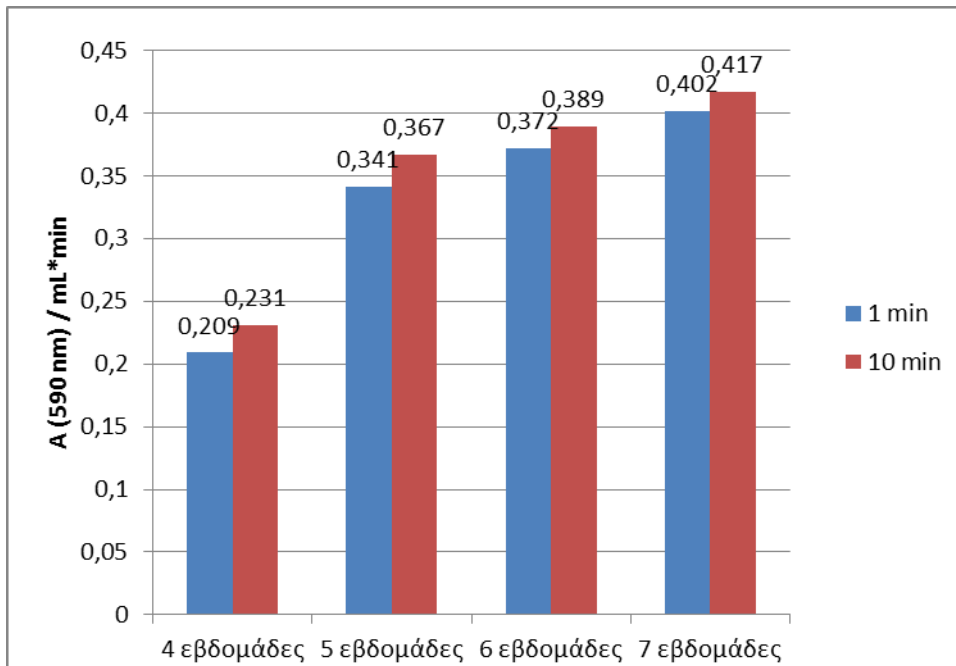
Σχήμα 10 : Απορρόφηση του ενζύμου λακκάση κατά την ανάπτυξη καλλιέργειας μανιταριών Pleurotus.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα αύξηση του χρόνου καλλιέργειας με τη πάροδο των εβδομάδων προκαλεί αύξηση της απορρόφησης του ενζύμου λακκάση. Απότομη μεταβολή στην αρχική απορρόφηση έχουμε μεταξύ τέταρτης και πέμπτης εβδομάδας.



Σχήμα 11 : Απορρόφηση του ενζύμου υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn κατά την ανάπτυξη καλλιέργειας μανιταριών Pleurotus.

Με αύξηση του χρόνου καλλιέργειας, με τη πάροδο των εβδομάδων παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης του ενζύμου υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn.



Σχήμα 12 : Απορρόφηση του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση κατά την ανάπτυξη καλλιέργειας μανιταριών *Pleurotus*.

Αύξηση του χρόνου καλλιέργειας με τη πάροδο των εβδομάδων προκαλεί αύξηση της απορρόφησης του ενζύμου Mn-Υπεροξειδάση. Απότομη μεταβολή στην αρχική απορρόφηση παρατηρήθηκε μεταξύ τέταρτης και πέμπτης εβδομάδας.

#### 5.4.2 Σύγκριση με καλλιέργεια από υγρά απόβλητα ελαιουργείου.

Για την απομόνωση βασιδιομυκήτων από το έδαφος χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα Soil Extract Agar (SEA) και Soil Basidiomycete Isolation medium (BSS2) μετά από επώαση στους 40°C. Ακολούθως εξετάστηκε η μυκηλιακή αύξηση των απομονωθέντων στελεχών μυκήτων σε τρυβλία που περιείχαν ως υπόστρωμα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ). Μετά από 28 μέρες επώασης παρατηρήθηκε μείωση των ολικών φαινολικών σε ορισμένα στελέχη που δηλώνει την παρουσία λακκάσης. Στα συγκεκριμένα στελέχη προσδιορίστηκε η δραστικότητα των ενζύμων λακκάση, Mn-υπεροξειδάση και υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn.

Για την παραγωγή θρεπτικού υποστρώματος Soil Extract Agar προστέθηκαν 100 g εδάφους σε 1 L απιονισμένου ύδατος. Το δείγμα ανακινήθηκε για 30 min στις 150 rpm. Μέσω διηθήσεως απομακρύνθηκε το στερεό υπόλειμμα, ενώ στο εκχύλισμα προστέθηκε ποσότητα απιονισμένου ύδατος μέχρι συμπλήρωσεως του όγκου αυτού στο 1 L. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH του εκχυλίσματος στη τιμή 6 με προσθήκη πυκνού διαλύματος φωσφορικού οξέος. Ακολούθησε προσθήκη 17 g / L άγαρ και το θρεπτικό υπόστρωμα (Soil Extract Agar) αποστειρώθηκε για 20 min στους 121° C υπό πίεση 1,1 Atm. Με το πέρας της αποστείρωσεως, προστέθηκαν ποσότητες τετρακυκλίνης και στρεπτομυκίνης έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών αυτών να είναι 50 µg ανά mL θρεπτικού υποστρώματος. Το υλικό μεταφέρθηκε ασηπτικά σε τρυβλία Petri, όπου αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

Ενώ για την παραγωγή θρεπτικού υποστρώματος Soil Basidiomycete Isolation Medium, -BSS2, σε 1 L θρεπτικού υλικού BSS2 προστέθηκαν :

0.4 ml quaiacol

2 g malt extract

0.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0.1 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

0.1 g KCl

0.02 g  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0.05 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O

15 g άγαρ

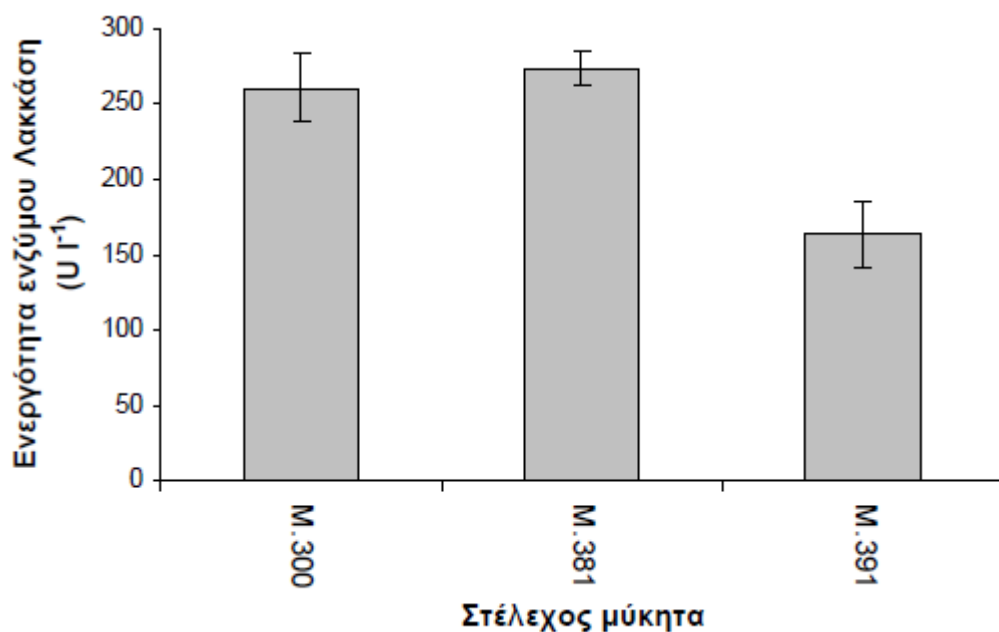
Σε 500 mL H<sub>2</sub>O προστέθηκαν το malt extract και το άγαρ και ακολούθησε ανάδευση υπό θέρμανση επί 30 min. Επίσης, προστέθηκαν οι προαναφερθείσες ποσότητες Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O και FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O σε 100 mL απιονισμένου νερού το καθένα, ενώ τα υπόλοιπα αντιδραστήρια διαλύθηκαν σε 300 mL απιονισμένου νερού. Τα παραπάνω διαλύματα ενώθηκαν και προστέθηκαν 5 mL διαλύματος KOH 1 M. Ακολούθησε αποστείρωση του θρεπτικού αυτού υποστρώματος στους 121°C υπό πίεση 1,1 atm για 20 min. Με το πέρας της αποστείρωσεως, προστέθηκαν ποσότητες τετρακυκλίνης, στρεπτομυκίνης, πενικιλίνης, benomyl και ο-φαινυλοφαινόλης, έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων αυτών να είναι αντίστοιχα 60, 30, 30, 40 και 6 μg ανά ml θρεπτικού υποστρώματος. Το θρεπτικό υπόστρωμα BSS2 μεταφέρθηκε ασηπτικά σε τρυβλία Petri, όπου αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας του ενζύμου λακκάση, υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάσης στα υγρά απόβλητα ελαιουργείου, ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος με τον προσδιορισμό ενζυμικού εκχυλίσματος από καλλιέργεια μανιταριών. Τα στελέχη παρουσίασαν σημαντική ενζυμική δραστικότητα, μεγαλύτερη από τον μάρτυρα, κυμαινόμενη από 163 έως 260 U / L. Στο σχήμα 13 παρουσιάζεται η δραστικότητα του ενζύμου λακκάση υπολογισμένη από τον τύπο

$$\text{Laccase activity} = d(A_{425\text{nm}}) / dt(\text{min}) \times E (\text{l/mol.cm}) \times V_{\text{reaction}} (\text{ml}) / V_{\text{sample}}(\text{ml})$$

όπου  $E(\text{l/mol.cm}) = 36 \text{ l/mol.cm}$ .





(Κοστρίβα, 2007)

Σχήμα 13 : Δραστικότητα του ενζύμου λακκάση στα στελέχη M.300, M.381 και M.391.

Η δραστικότητα των ενζύμων υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάση υπολογίστηκε από τον τύπο

$$\text{Background activity} = d(A590 \text{ nm})/dt(\text{min}) \times E (\text{l/mol.cm}) \times V_{\text{reaction}} (\text{ml})/V_{\text{sample}}(\text{ml})$$

όπου  $E (\text{l/mol.cm})=32,9 \text{ l/mol.cm}$ .

Χαρακτηριστικά για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης Mn

$$\text{AP} = \text{Independent peroxidase activity} + \text{Background activity} = d(A590 \text{ nm})/dt(\text{min}) \times E (\text{l/mol.cm}) \times V_{\text{reaction}} (\text{ml})/V_{\text{sample}}(\text{ml})$$

όπου  $E (\text{l/mol.cm})=32,9 \text{ l/mol.cm}$ .

Η ενεργότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένης του Mn) υπολογίζεται από την AR με αφαίρεση της παρεμβολής του υποστρώματος (Background activity). Επομένως : Independent peroxidase activity = AP - Background activity

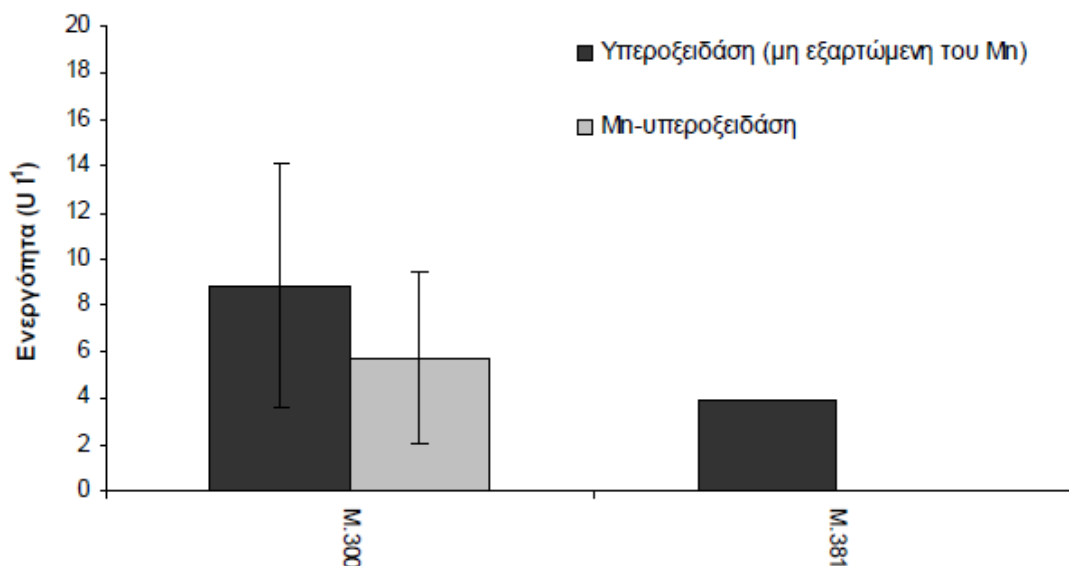
Ενώ για τον προσδιορισμό της δραστικότητας Mn-υπεροξειδάσης

$AR = \text{Mn-peroxidase activity} + \text{Independent peroxidase activity} + \text{Background activity} = d(A590 \text{ nm})/dt(\text{min}) \times E (\text{l/mol.cm}) \times V_{\text{reaction}} (\text{ml})/V_{\text{sample}}(\text{ml})$

όπου  $E (\text{l/mol.cm})=32,9 \text{ lt/mol.cm}$ .

Η ενεργότητα του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση υπολογίζεται από τον προσδιορισμό της AR με αφαίρεση της τιμής της AP (Independent peroxidase + Background activity). Επομένως : Mn-peroxidase activity = AR - AP

Στο σχήμα 14 παρουσιάζεται η δραστικότητα των ενζύμων υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάση



(Κοστρίβα, 2007)

Σχήμα 14 : Δραστικότητα των ενζύμων υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάση.

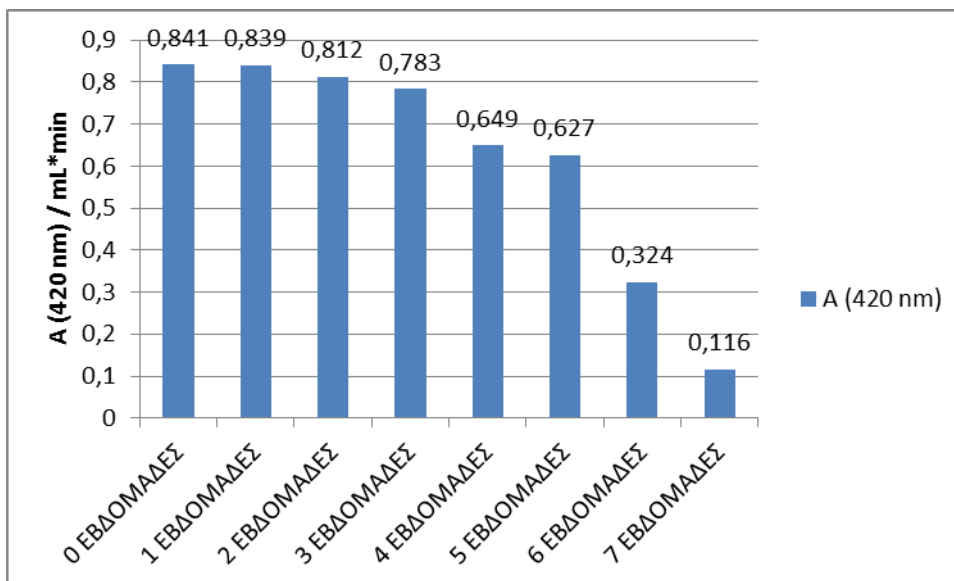
Στην περίπτωση του υποστρώματος του στελέχους M.381, ενεργότητα του ενζύμου υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn προσδιορίστηκε σε μια μόνο επανάληψη.

Στα στελέχη που προσδιορίστηκε η δραστικότητα του ενζύμου λακκάση και υπεροξειδάση εξαρτημένης και μη μαγγανίου παρατηρήθηκε και αποχρωματισμός στερεών υποστρωμάτων ΥΕΑ. Οι μύκητες αυτοί ανήκουν πιθανότητα στην κατηγορία μυκήτων λευκής σήψης. Οι μύκητες

λευκής σήψης του γένους *Pleurotus* είναι εκλεκτικοί αποδομητές της λιγνίνης, εξαιτίας του ενζυμικού μηχανισμού αποδόμησης των φαινολικών συστατικών που διαθέτουν, μειώνοντας σημαντικά την φυτοτοξική δράση των ΥΑΕ και προκαλώντας ταυτόχρονα τον αποχρωματισμό τους (Κοστρίβα, 2007). Έτσι δικαιολογείται και η παρόμοια δράση της λακκάσης και υπεροξειδάσης κατά την ανάπτυξη καλλιέργειας μανιταριών. Μπορεί να μελετήθηκε η δραστηριότητα των ενζύμων μέχρι την 28<sup>η</sup> μέρα στην περίπτωση των ΥΕΑ, ενώ στην καλλιέργεια μανιταριών από την 28<sup>η</sup> και μετά, αλλά η αύξηση της δράσης των ενζύμων αυξάνεται βδομάδα με τη βδομάδα και στις δύο περιπτώσεις.

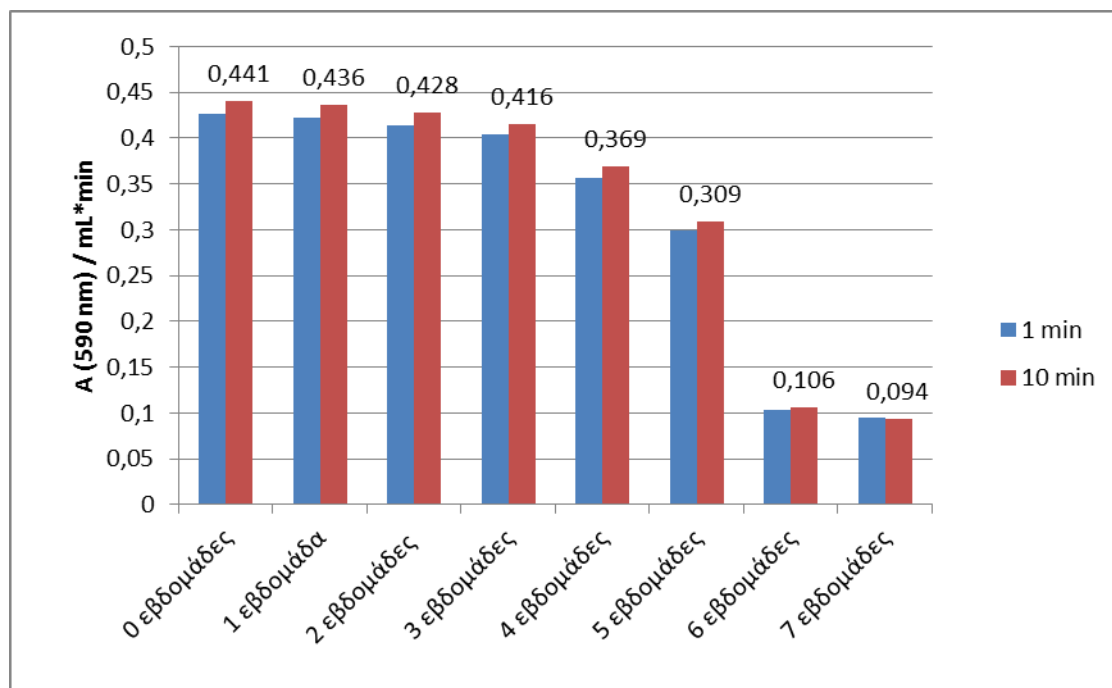
### 5.5 Χρόνος επίδρασης του ενζύμου

Το ενζυμικό εκχύλισμα που αποθηκεύεται σε θερμοκρασίες ψυγείου δείχνει να έχει απορρόφηση για κάποιο χρονικό διάστημα. Αυτό ισχύει τόσο για το ένζυμο λακκάση όσο και για το ένζυμο υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω σχήματα.



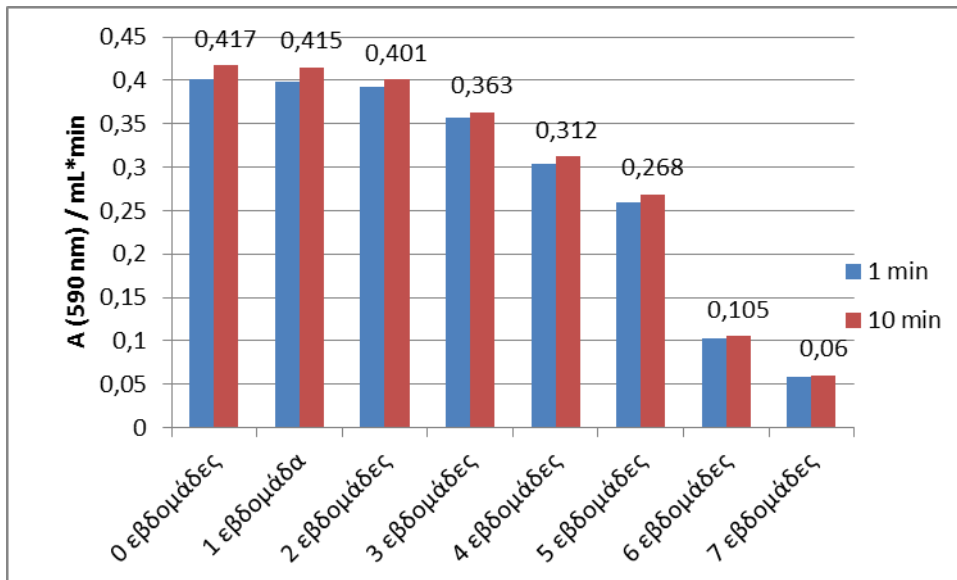
Σχήμα 15 : Επίδραση του χρόνου στην ενζυμική απορρόφηση της λακκάσης σε μανιτάρια *Pleurotus* εμπορίου.

Με τη πάροδο του χρόνου το ενζυμικό εκχύλισμα λακκάσης έχει όλο και χαμηλότερη απορρόφηση, με απότομη μεταβολή την έκτη εβδομάδα. Την έβδομη εβδομάδα δεν παρουσιάζει σχεδόν καμία μεταβολή στην απορρόφηση.



Σχήμα 16 : Επίδραση του χρόνου στην ενζυμική απορρόφηση της υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης Mn σεμανιάρια Pleurotus εμπορίου.

Με τη πάροδο του χρόνου το ενζυμικό εκχύλισμα υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης Mn έχει όλο και χαμηλότερη απορρόφηση, με απότομη μεταβολή την έκτη εβδομάδα. Την έκτη και έβδομη εβδομάδα δεν παρουσιάζει σχεδόν καμία μεταβολή στην απορρόφηση.



Σχήμα 17 : Επίδραση του χρόνου στην ενζυμική απορρόφηση της Mn-υπεροξειδάσης σε μανιτάρια Pleurotus εμπορίου.

Με τη πάροδο του χρόνου το ενζυμικό εκχύλισμα Mn-υπεροξειδάσης έχει όλο και χαμηλότερη απορρόφηση, με απότομη μεταβολή την έκτη εβδομάδα. Την έκτη και έβδομη εβδομάδα δεν παρουσιάζει σχεδόν καμία μεταβολή στην απορρόφηση.

## 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα σκοπός της πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της απορρόφησης των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάση κατά την ανάπτυξη καλλιέργειας μανιταριών.

Κατά την παρακολούθηση της μεταβολής της απορρόφησης του ενζύμου λακκάση παρατηρήθηκε πως η άριστη θερμοκρασία επώασης του είναι 40° C και το άριστο pH 5.

Οι ουσίες MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>INO<sub>3</sub> λειτουργούν ως επιταχυντές της δράσης του ενζύμου λακκάση, ενώ οι ουσίες AgNO<sub>3</sub>, NaN<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, DTT λειτουργούν ως αναστολείς της δράσης του. Η δράση του ενζύμου λακκάση μένει ανεπηρέαστη από την προσθήκη KCl και NH<sub>4</sub>Cl.

Με τη πάροδο του χρόνου καλλιέργειας μετρούμενου σε εβδομάδες η απορρόφηση των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάση αυξάνεται.

Το ενζυμικό εκχύλισμα αποθηκευμένο σε θερμοκρασία ψυγείου παρουσιάζει μεταβολή στην απορρόφηση, καθώς παρατηρείται μείωση αυτής με τη πάροδο του χρόνου και στο διάστημα μεταξύ έκτης και έβδομης εβδομάδας παρατηρείται μηδενική μεταβολή στην απορρόφηση των ενζύμων. Αυτό ισχύει τόσο για το ένζυμο λακκάση όσο και για το ένζυμο υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn και Mn-υπεροξειδάση.

## 7. ΠΡΩΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΕΤΑΙΡΟ ΜΕΛΕΤΗ

- Θα ήταν χρήσιμο να γίνει έρευνα για τον αποχρωματισμό της μελασας αστικών λυμάτων με το ένζυμο υπεροξειδάση (Εξαρτημένης ή μη μαγγανίου) και σύγκριση με την μέθοδο αποχρωματισμού της μελασας με τη χρήση όζοντος.

- Επίσης, εφαρμογή της ίδιας μεθόδου με ίδιες παραμέτρους αλλά με διαφορετικό υπόστρωμα, εκτός ABTS και εκλογή του καταλληλότερου για τη δράση των ενζύμων λακκάση, Mn- υπεροξειδάση και υπεροξειδάση μη εξαρτημένης Mn.
- Εφαρμογή της ίδιας μεθόδου με διαφορετικές παραμέτρους (pH, θερμοκρασία) για την εκλογή των κατάλληλοτερων για το ενζύμο υπεροξειδάση (εξαρτημένης ή μη μαγγανίου), καθώς και προσθήκη ουσιών για τον προσδιορισμό τους ως επιταχυντές η αναστολής της δράσης του ενζύμου υπεροξειδάση.
- Με τη χρήση ίδιας μεθόδου με σταθερές παραμέτρους (ιδανικές), σύγκριση απορρόφησης του ενζύμου υπεροξειδάση προερχόμενης από διαφορετικές πηγές (μανιτάρια, βυνη, θραψαλα κλπ).

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### ΞΕΝΗ

- Aslam M. S., Aishy A., Samra Z. Q., Gull I., Amin M. (2012). Identification, purification and characterization of a novel extracellular Laccase from *Cladosporium Cladosporioides*. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* ch 26. Pp 3345-3348.
- Banci L. (1999). Solution structure of reduced horse heart cytochrome c. *J Biol Inorg Chem*, 4, 21-31
- Belitz, H-D., Grosch W. P (1999). Enzymes. In: *Food chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., ch. 2, p. 93-98, 103, 104, 106, 125-127, 133, 141, 146, Springer, New York
- Copeland A.R. (1996). Experimental measures of enzyme activity. In: *Enzymes A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*, ch. 6, pp 131, 136, 137, 164, 175, Wiley-VCH, New York

- Cornish-Bowden A. (1995). Environmental effects of enzymes. In: Fundamentals of Enzyme Kinetics. ch. 8, pp 192-195, Portland Press, London
- Cornish-Bowden A. (1995). Inhibitors and Activation of Enzymes. In: Fundamentals of Enzyme Kinetics. ch. 5, pp 93, 94 Portland Press, London
- Enzyme nomenclature (1992) Classification and nomenclature. In: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB, USA
- Lehninger L. A. (1975). Enzymes: kinetics and inhibitors. In: Biochemistry, the molecular basis of cell structure and function, 2<sup>nd</sup> edition, ch. 8, pp 195-197, 200, 201 Worth Publishers, London
- Lehninger L. A. (1975). Proteins: Purification and Characterization. In : Biochemistry, the molecular basis of cell structure and function, 2<sup>nd</sup> edition, ch. 7, pp 158-160, 162 Worth Publishers, London
- Minussi R. S. (2002). 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 Journal of Biotechnology , 6 , pp. 1248-1254
- Palmer P. I. (2001) Quantifying the seasonal and interannual variability of North American isoprene emissions using satellite observations of the formaldehyde column, Journal of Geophysical research , 111, pp 1984-2012
- Royer G. P. (1997). Enzyme. In: McGraw-Hill Encyclopedia of science and technology, 8<sup>th</sup> ed .ch 6, pp 483 McGraw-Hill, New York
- Stellwag, E. J. (1997). Enzyme. In: McGraw-Hill Encyclopedia of science and technology, 8<sup>th</sup> ed, ch. 6, pp 485, 487, 490, McGraw-Hill, London
- Thurston C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. In : Microbial Physiology Research Group, pp 165-168, 172, Campden Hill Road, London



- Walmsley A. (1996) Physical factors affecting activity. In: Enzymology (Eds. Engel p. C., Hames B. D., Rickwood D.), pp 190, Academic Press, New York
- Wellner D. (1997). Enzyme. In: McGraw-Hill Encyclopedia of science and technology, 8<sup>th</sup> ed, ch. 6 pp 481-487, McGraw-Hill, New York
- Whitaker J.R. (1985) Analytical uses of enzymes. In: Food Analysis Principles and Techniques. (Eds. Gruenwedel D. W., Whitaker J. R.), pp 298-299, 303-305, 310-312, 314, 330 Biological, Marcel Dekker, New York
- Whitaker J.R. (1993) Enzymes. In: Encyclopedia of food science food technology and nutrition (Eds. Macrae R., Robinson K. R., Sadler M. J.), pp 1629-1633, Academic Press, London

#### ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Γεωργάτσος Ι. Γ., (1991). Αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα. Στο : Ενζυμολογία. 3<sup>η</sup> έκδοση, κεφ. 6, σ. 86-87, Εκδόσεις Γιαχούδη – Γιαπουλή Ο.Ε., Θεσσαλονίκη
- Γεωργάτσος Ι. Γ., (1991). Η δομή των ενζύμων. Στο : Ενζυμολογία. 3<sup>η</sup> έκδοση, κεφ. 2, σ. 5, 8-15, 21, Εκδόσεις Γιαχούδη – Γιαπουλή Ο.Ε., Θεσσαλονίκη
- Γεωργάτσος Ι. Γ., (1991). Η εξειδίκευση των ενζύμων. Στο : Ενζυμολογία. 3<sup>η</sup> έκδοση, κεφ. 11, σ. 11, 161-167, Εκδόσεις Γιαχούδη – Γιαπουλή Ο.Ε., Θεσσαλονίκη
- Κοστίβα Α., (2007). Μελέτη της αποδόμησης υγρών αποβλήτων με τη χρήση αυτόχθονων μυκήτων εδάφους. Πανεπιστήμιο Αιγαίου. Τμήμα Περιβάλλοντος.
- Ηλιόπουλος Γ. (1998). Ένζυμα. Στο : Βιοχημεία. κεφ.2, σ. 29-56, ΟΕΔΒ, Αθήνα
- Χουρζαμάνογλου Γ., (2008). Καθαρισμός και μελέτη ιδιοτήτων λυτικού ενζύμου από *Thermus Thermophilus*. σ. 22-25, Θεσσαλονίκη

