

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Τμήμα ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

### ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ  
«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΛΑΚΑΣΗΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ  
ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΛΕΥΚΗΣ ΣΗΨΗΣ»

Δημήτριος Καρπούζας, Καθηγητής ([dkarpouzas@bio.uth.gr](mailto:dkarpouzas@bio.uth.gr))  
Παναγιώτης Καράς, Ακαδημαϊκός Υπότροφος ([pkaras@bio.uth.gr](mailto:pkaras@bio.uth.gr))

## ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

### Μύκητες Λευκής Σήψης:

- Αποτελούν μια ομάδα μυκήτων με κοινά οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά παρά μια ομάδα ταξινομικά διακριτή.
- Στη συντριπτική τους πλειοψηφία αποτελούνται από βασιδιομύκητες
- Προκαλούν χαρακτηριστική λευκή σήψη όταν αναπτύξουν το μυκήλιο τους σε νεκρή οργανική ύλη όπως ξύλα και γενικά υποστρώματα πλούσια σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη



## Μύκητες Λευκής Σήψης:

Θεωρήθηκαν ιδανικοί για την βιολογική απορρύπανση 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 διασπαστούν με αποτέλεσμα να μπορούν να επιτελέσουν τουλάχιστον **τα πρώτα καταβολικά βήματα στην διάσπαση** δύσκολα βιοαποδομήσιμων οργανικών ρύπων

### Τα ένζυμα που παράγουν οι μύκητες λευκής σήψης:

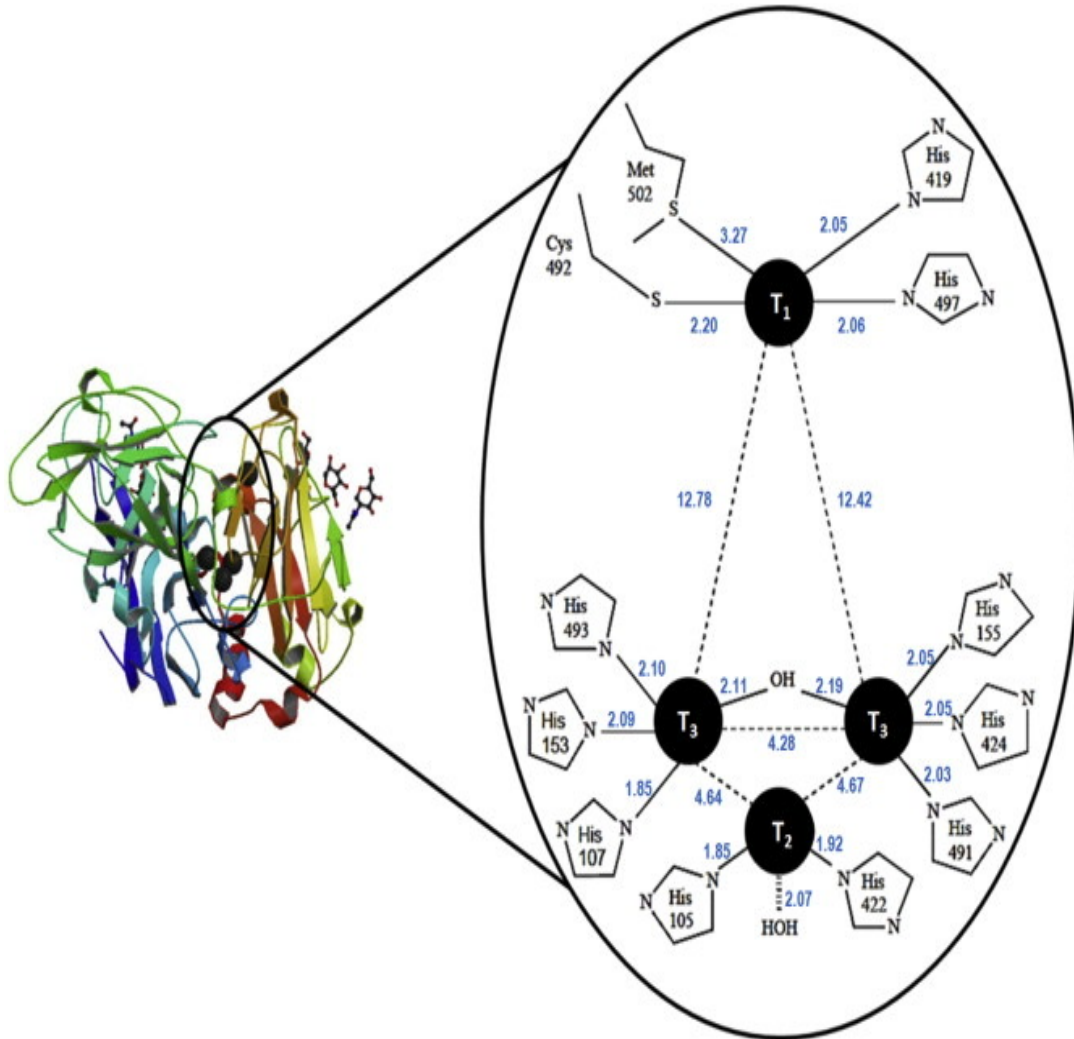
- **Εξαρτώμενες της λιγνίνης υπεροξειδάσες (LiP):** Οξειδώνουν μη φαινολικά τμήματα της λιγνίνης αφαιρώντας ένα e<sup>-</sup> και δημιουργώντας μια κατιονική ρίζα που στη συνέχεια αποδομούνται με χημικές διεργασίες
- **Εξαρτώμενες του Μαγγανίου υπεροξειδάσες (MnP):** Οξειδώνει Mn<sup>+2</sup> σε Mn<sup>+3</sup> που στην συνέχεια οξειδώνει φαινολικούς δακτυλίους δημιουργώντας φαινοξικές ρίζες που είναι ασταθείς και διασπώνται χημικά
- **Λακάσες (Lac):** αποτελεί μία Cu-οξειδάση που χρησιμοποιούν ένα μοριακό οξυγόνο ως οξειδωτικό και οξειδώνουν φαινολικούς δακτυλίους προς φαινοξικές ρίζες.

## Ενζυμικό οπλοστάσιο

### Τα ένζυμα που παράγουν οι μύκητες λευκής σήψης:

- Εξαρτώμενες της λιγνίνης υπεροξειδάσες (LiP): Οξειδώνουν μη φαινολικά τμήματα της λιγνίνης αφαιρώντας ένα e<sup>-</sup> και δημιουργώντας μια κατιονική ρίζα που στη συνέχεια αποδομούνται με χημικές διεργασίες
- Εξαρτώμενες του Μαγγανίου υπεροξειδάσες (MnP): Οξειδώνει Mn<sup>+2</sup> σε Mn<sup>+3</sup> που στην συνέχεια οξειδώνει φαινολικούς δακτυλίους δημιουργώντας φαινοξικές ρίζες που είναι ασταθείς και διασπώνται χημικά
- **Λακάσες (Lac):** αποτελεί μία Cu-οξειδάση που χρησιμοποιούν ένα μοριακό οξυγόνο ως οξειδωτικό και οξειδώνουν φαινολικούς δακτυλίους προς φαινοξικές ρίζες.

## Λακάσες



- Ανήκει στην κατηγορία των οξειδασών
- Περιέχει πολλά ενεργά κέντρα ιόντων χαλκού (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> και T<sub>4</sub>) και η δράση της συνοδεύεται από αναγωγή του οξυγόνου σε νερό
- Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν τα τυπικά υποστρώματα δράσης της, η οξείδωση των οποίων γίνεται με τη διαδικασία μεταφορά ηλεκτρονίων στα ενεργά κέντρα του ενζύμου
- Υψηλή θερμική αντοχή (σταθερή στους 60 °C)
- Δρα σε μεγάλο εύρος ουσιών (μικρή εκλεκτικότητα στο υπόστρωμα)

## ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

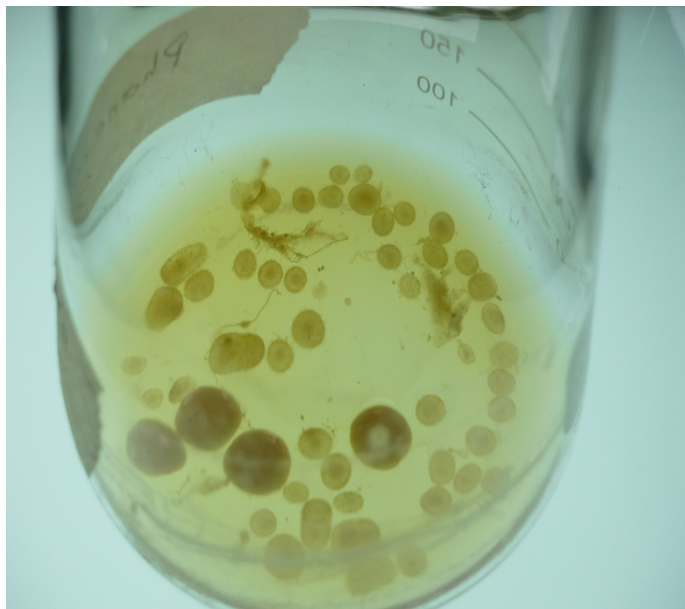
### Μέθοδος προσδιορισμού της λακάσης σε καλλιέργειες μυκήτων λευκής σήψης :

- Ανάπτυξη μυκήτων λευκής σήψης σε θρεπτικό μέσο εκχυλίσματος αχύρου (καλλιέργεια 50 ml)

*Pleurotus ostreatus*

*Ganoderma sp*

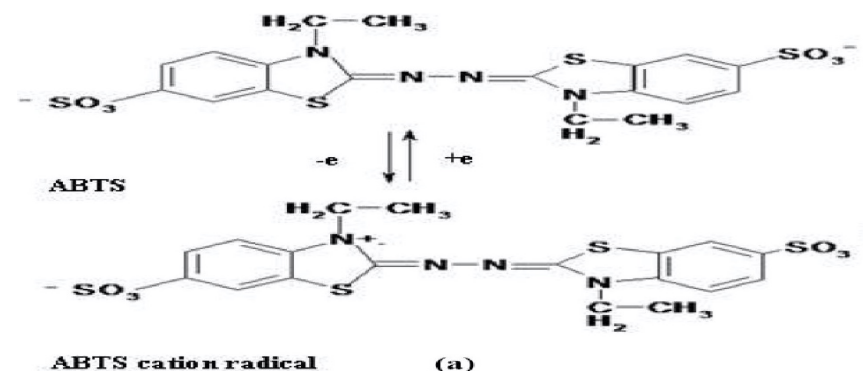
- Επώαση των καλλιεργειών για μια βδομάδα (25 οC, 120 rpm) και παραλαβή υπερκείμενου για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου λακάσης



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

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

\* Το ABTS είναι το υπόστρωμα – παρουσία του ενζύμου λακάση υφίσταται οξείδωση που οδηγεί στην παραγωγή μιας κατιονικής ρίζας που παρουσιάζει γέγιστη απορρόφηση στα 425 nm





## Μετρήσεις απορρόφησης

ΧΡΟΝΟΣ (sec)	Απορρόφηση (425 nm)
0	-0,269
20	-0,221
40	-0,188
60	-0,163
80	-0,131
100	-0,123
120	-0,107
140	-0,093
160	-0,082
180	-0,072

## Υπολογισμός της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου λακάση

### ΝΟΜΟΣ BEER - LAMBERT:

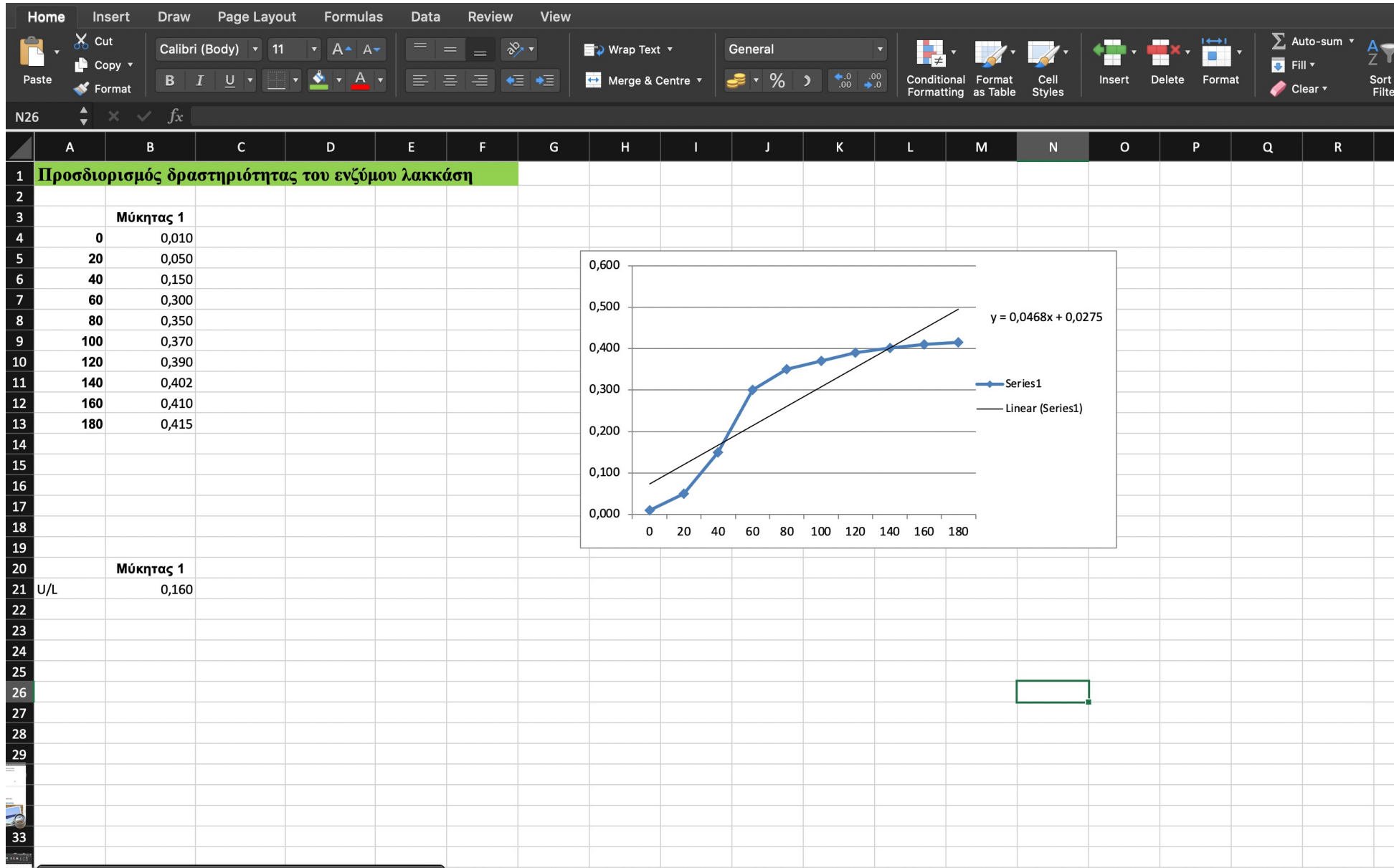
$$\text{Laccase activity} = \left[ \frac{d(A_{425 \text{ nm}})}{dt \text{ (min)} \times E \text{ (lt/mol.cm)}} \right] \times V_{\text{reaction}} \text{ (ml)} / V_{\text{sample}} \text{ (ml)}$$

- όπου **d(A<sub>425nm</sub>)**: η μέγιστη διαφορά της απορρόφησης (μεταξύ δυο διαδοχικών μετρήσεων) 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<sub>reaction</sub>**: είναι ο τελικός όγκος της αντίδρασης στην κυψελίδα (σε ml)
- **V<sub>sample</sub>**: είναι ο αρχικός όγκος της καλλιέργειας που πάρθηκε το δείγμα (σε ml) (100 ml)

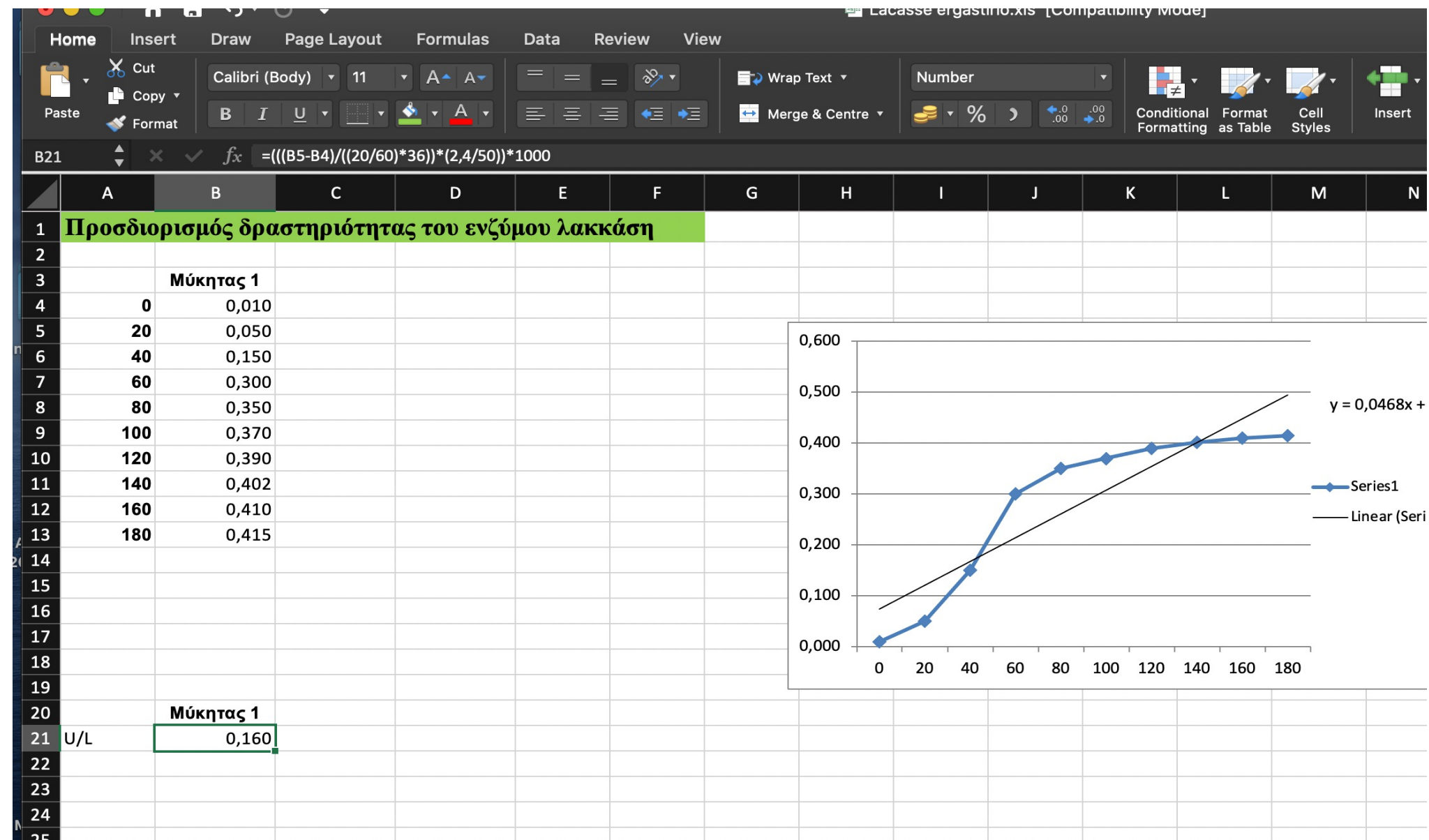
## Εργαστηριακή Αναφορά

- Υπολογισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της λακάσης σε **Units/ml ή Units/L**
- Γραπτή αναφορά της εργαστηριακής άσκησης (αρχείο word)

# Εργαστηριακή Αναφορά "spoil"



## Εργαστηριακή Αναφορά "spoil"



# Εργαστηριακή Αναφορά "spoil"

Lacasse ergastirio.xls [Compatibility Mode]

Home Insert Draw Page Layout Formulas Data Review View

Calibri (Body) 11

Wrap Text Merge & Centre

Number

Conditional Formatting Format as Table Cell Styles

Insert Delete Form

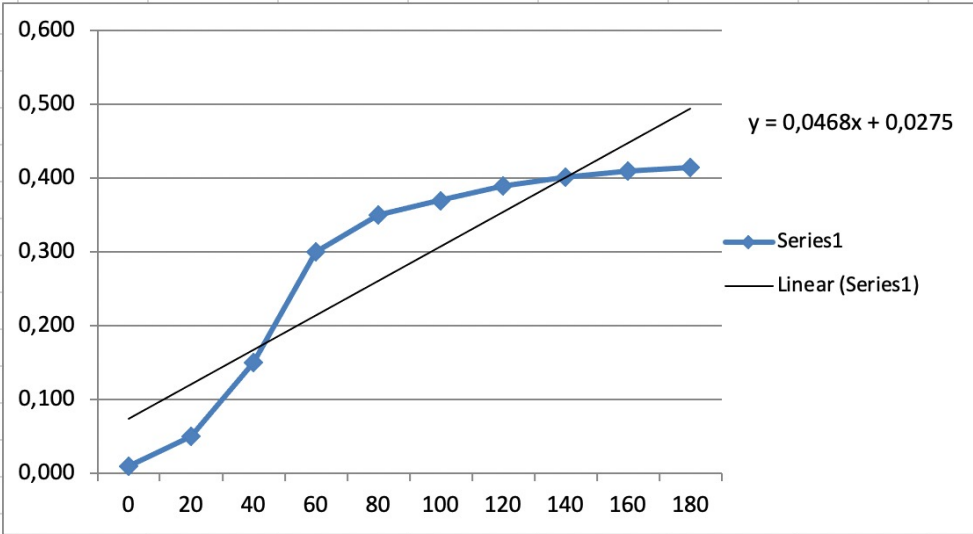
SUM  $= (B5-B4) / 20/60 * 36 * 2,4/50) * 1000$

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	<b>Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση</b>														
2															
3		<b>Μύκτης 1</b>													
4	0	0,010													
5	20	0,050													
6	40	0,150													
7	60	0,300													
8	80	0,350													
9	100	0,370													
10	120	0,390													
11	140	0,402													
12	160	0,410													
13	180	0,415													
14															
15															
16															
17															
18															
19															
20		<b>Μύκτης 1</b>													
21	U/L	$2,4/50) * 1000$													
22															
23															
24															

Συντελεστής Απόσβεσης

Χρόνος ( min)

Διαφορά απορρόφησης



$y = 0,0468x + 0,0275$

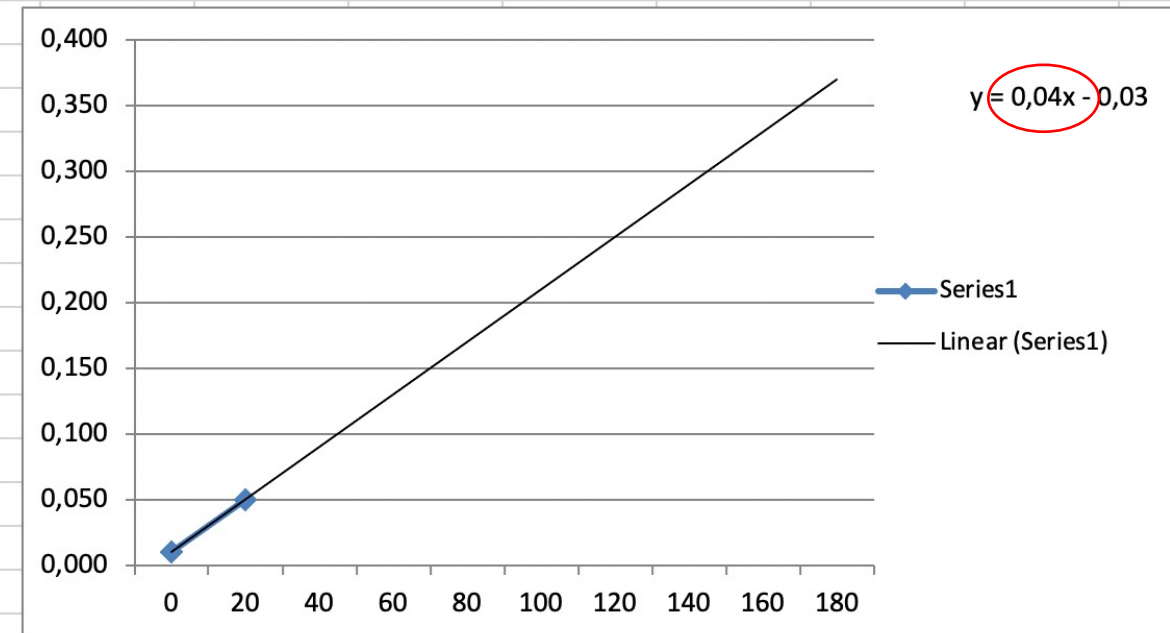
Series1

Linear (Series1)

## Εργαστηριακή Αναφορά "spoil"

Μέγιστη διαφορά στην απορρόφηση = Μέγιστη κλίση στην εφαπτόμενη της καμπύλης

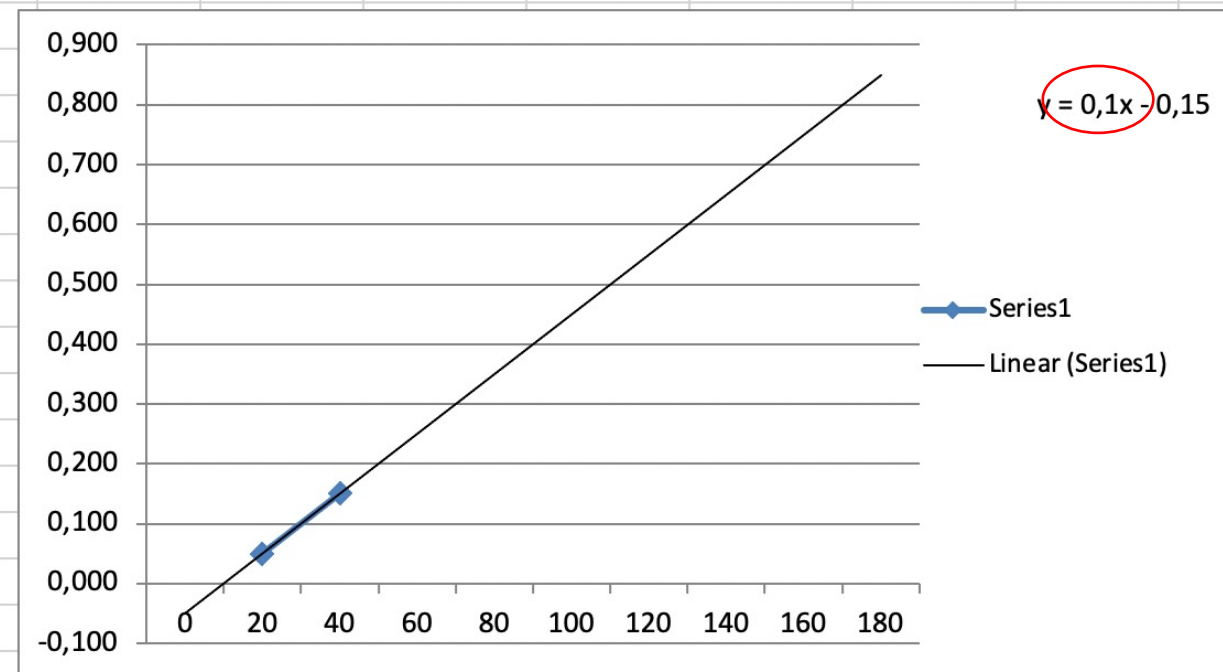
	Μύκτης 1
0	0,010
20	0,050
40	
60	
80	
100	
120	
140	
160	
180	
	Μύκτης 1
U/L	0,160



## Εργαστηριακή Αναφορά "spoil"

Μέγιστη διαφορά στην απορρόφηση = Μέγιστη κλίση στην εφαπτόμενη της καμπύλης

	Μύκητας 1
0	
20	0,050
40	0,150
60	
80	
100	
120	
140	
160	
180	



	Μύκητας 1
U/L	0,200