

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos IV kurso studento

Dovilės PATLABAITĖS

Bakalaurinis darbas

***Didymocrea* sp lakazės izofermentų biosintezė, gryninimas ir
savybių tyrimas**

Darbo vadovas (-ai) dr. R. Vidžiūnaitė

Vilnius 2019

***Didymocrea* sp lakazės izofermentų biosintezė, gryninimas ir savybių tyrimas**

Darbas atliktas Biochemijos instituto Bioanalizės skyriuje

Darbą atliko:

Dovilė Patlabaitė

Darbo vadovai:

Dr. Regina Vidžiūnaitė

TURINYS

Santrumpos	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1 Fermentai ir jų klasifikacija	8
1.2 Lakazės	9
1.3 Paplitimas.....	10
1.3.1 Augaluose	10
1.3.2 Prokariotuose	11
1.3.3 Vabzdžiuose	11
1.3.4 Grybuose.....	11
1.4 Grybinės lakazės	12
1.5 Lakazės struktūra	14
1.6 Veikimas	16
1.7 Gryninimas.....	19
1.8 Induktorių įtaka lakazių produkcijai	19
1.9 Faktorių įtaka aktyvumui	20
1.10 Panaudojimas	21
1.10.1 Biodegradacija	22
1.10.2 Biosensoriai	23
1.10.3 Farmacijos sektorius	23
1.10.4 Organinė sintezė	24
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	25
2.1 Auginimas	25
2.2 Gryninimas.....	25
2.3 pH ir temperatūrinis optimumas	26
2.4 Izofermentų stabilumas	26
2.5 Medžiagos ir reagentai:.....	26
2.6 Kinetiniai matavimai:.....	27
2.7.1 Substratinio specifiškumo tyrimai.....	27
2.7.2 pH įtaka reakcijos greičiui	27
2.7.3 Įvairių druskų poveikis izofermentų aktyvumui	27
2.7.4 Duomenų analizė ir konstantų skaičiavimai	28

TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	29
3.1 Didymocrea sp J61 izofermentų gryninimas.....	29
3.2 Izofermentų stabilumas, temperatūrinis ir pH optimumai	31
3.3 Substratinis savitumas.....	33
3.4 Aktyvumo priklausomybė nuo pH.....	38
3.5 Metalų druskų įtaka	39
IŠVADOS.....	43
SANTRAUKA	44
SUMMARY	45
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	46
PRIEDAI	51

Santrumpos

HQ – hidrochinonas

FERO – kalio heksacianoferatas(II)

MS – metilsiringatas

CAT – pirokatecholis

PZ – promazinas

SYR – syringaldazinas

CAA – kavos rūgštis

AMB - *N,N'*-dimetilamino-4-(4-morfolino)benzenas

PPA - 3(10H-fenoksazino-10-yl)etanolis

DMP - 2,6-dimetoksifenolis

PDA – p-fenilendiaminas

K_M – Michaelis-Menten konstanta

$V_{\max}$ – maksimalus fermentinės reakcijos greitis

k_{kat} – katalizinė konstanta

k_{bim} – bimolekulinė fermento ir substrato reakingumo konstanta

K-P – kalio fosfatinis buferis

BRB – Britton-Robinson trikomponentis buferinis tirpalas (boro, fosforo ir acto r.)

IVADAS

Lakazės (EC 1.10.3.2) vieni seniausių ir daugiausiai tyrinėtų fermentų. Jos plačiai paplitusios gamtoje, tarp aukštesniųjų augalų, vabzdžių, prokariotų ir grybų, kiekviename iš jų atlieka atitinkamai skirtingas funkcijas. Gausiausiai randamos ir geriausiai ištyrinėtos grybinės lakazės, kurios ir pristatomos šiame darbe. Tai dažniausiai užląsteliniai fermentai, dalyvaujantys lignino degradacijoje, morfogenezeje, atsake į stresą, pigmentacijoje, patogenezėje. Taip pat jos atsakingos už toksinių fenolinių medžiagų pašalinimą iš natūralios grybui augimo aplinkos.

Lakazės katalizuoja oksidacijos – redukcijos reakcijas, perkeliant elektroną nuo vienos molekulės (oksidatoriaus), ant kitos (reduktoriaus). Savo kataliziniame centre turi keletą vario atomų, todėl dar gali būti vadinamos multivarinėmis oksidazėmis. Geba katalizuoti įvairių kompleksinių organinių junginių oksidaciją, naudojant deguonį kaip oksiduojantį agentą, tuo pačiu redukuojant deguonį iki vandens.

Dėl savo paprastai plataus substratinio specifiškumo, taip pat stabilumo, auginimo ir gryninimo pigumo, yra itin patrauklios biotechnologijoje. Pramoniniam fermentų panaudojimui, jų biosintezė gali būti suintensyvinama panaudojant induktorius, įvairias druskas, palaikant atitinkamą pH ir temperatūrą. Atlikta nemažai tyrimų, ieškant optimalių lakazės biosintezės sąlygų, ženkliai padidinančių išeigą. Šiuo metu lakazės gana plačiai naudojamos maisto, kosmetikos, popieriaus, medienos, tekstilės pramonėje, aplinkos teršalų biotransformacijoje, bioremediacijoje, biosensorių gamyboje bei organinėje sintezėje.

Dauguma lakazes produkuojančių grybų geba sekretuoti keletą jos izoformų. Izofermentai gali skirtis savo katalizinėmis savybėmis, stabilumu, substratiniu specifiškumu. Buvo manyta, kad skirtumai atsiranda dėl potransiacinių modifikacijų variacijų viename gene, tačiau vėliau pastebėta, kad įvairios grybų rūšys turi daugiau nei vieną geną koduojantį lakazes. Pakankamai didelė lakazių izoformų įvairovė susijusi su adaptacija prie aplinkos sąlygų, siekiant užtikrinti optimalų fermento veikimą.

Šiame darbe naudota *Didymocrea sp* lakazė, kuri jau buvo tyrinėta adsorbavus ją ant aukso nanodalelių. Tyrimo metu pastebėta, kad pakeitus auginimo sąlygas, grybas produkuoja ir antrąją izoformą. Tyrime išgrynintos abi izoformos ir palygintas jų substratinis specifiškumas bei pH įtaka, temperatūrinis stabilumas, metalų druskų įtaka jų aktyvumui.

Šio darbo tikslas – išgryninti lakazės iš *Didymocrea* sp. grybo izofermentus bei ištirti fiziko-chemines bei kinetines jų savybes. Tikslo įgyvendinimui buvo iškelti tokie uždaviniai:

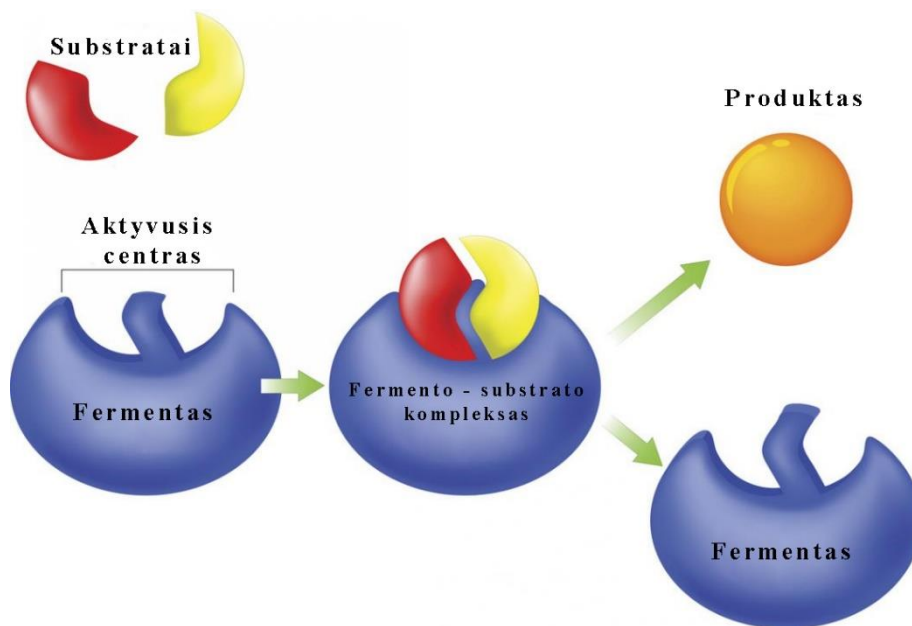
- 1) Išgryninti fermento izoformas;
- 2) Nustatyti optimalias fermento veikimo sąlygas;
- 3) Ištirti lakazės izofermentų savitumą substratams bei nustatyti buferinio tirpalo pH įtaką šių substratų oksidacijos greičiui, naudojant spektrofotometrinį metodą;
- 4) Ištirti įvairių metalų druskų įtaką lakazės izofermentų aktyvumui.

Šio darbo rezultatai pristatyti tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „The Vital Nature Sign 2019“. Stendinis pranešimas pristatytas konferencijos dalyviams 3 min trukmės pranešime. Santrauka pateikta priede.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Fermentai ir jų klasifikacija

Fermentai, tai baltyminiai katalizatoriai, kurie pagreitina reakcijų greitį iki tūkstančių kartų. Fermentų veikimo mechanizmas priklauso nuo gebėjimo pagreitinti reakcijos greitį, mažinant aktyvacijos energiją. Reakcijos metu fermentas prisijungia prie substrato ir sudaro trumpalaikį fermento/substrato kompleksą. Reakcijos pabaigoje susidaro produktas (-ai), o fermentas lieka nepakitęs, gali jungtis prie kito substrato ir gali būti pakartotinai naudojamas daug kartų (**1 pav**).

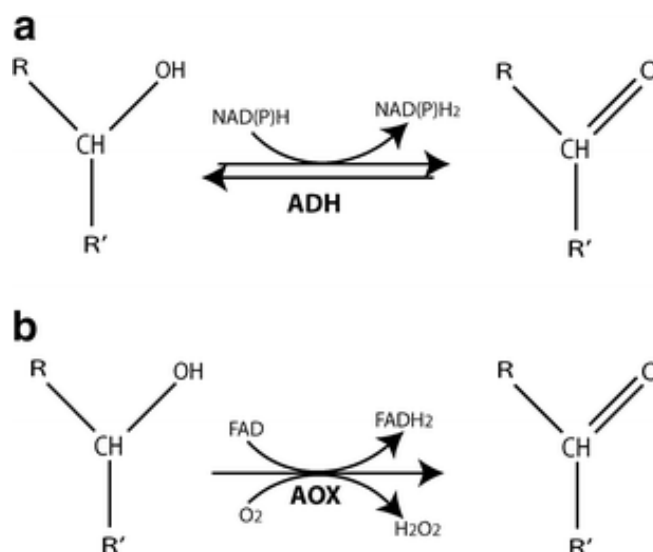


1 pav. Bendra fermentų veikimo schema.

Fermentai skirstomi į šešias klases, pagal jų katalizuojamas reakcijas, t. y., oksidoreduktazės, transferazės, hidrolazės, liazės, ligazės ir izomerazės. Didžiausia fermentų grupė – oksidoreduktazės, kurioms priklauso ir lakazės.

Jos katalizuoja oksidacijos – redukcijos reakcijas, perkeliant elektroną nuo vienos molekulės (oksidatoriaus), ant kitos (reduktoriaus). Gali būti skirstomos į poklasius – oksidazės arba dehidrogenazės. Oksidazės katalizuoja reakcijas, kuriose vandenilio akceptorius yra deguonis (O_2), pavyzdžiui alkoholio oksidazės, tiesiogiai konvertuoja alkoholius iki atitinkamų aldehydų ir ketonų atpalaiduojant vandenilio peroksidą, kaip kofaktorių naudoja flavino adenino dinukleotidą (FAD) (Goswami et al., 2013). Tuo tarpu dehidrogenazės oksiduoja substratą perkeliant vandenilio atomą ant elektronų akceptoriaus, kuris paprastai yra $NAD^+/NADP^+$ (**2 pav**). Alkoholio dehidrogenazės, skirtingai nei oksidazės, katalizuoja ir grįžtamąją alkoholių dehidrogenizaciją iki

karboksilo junginių, reikalingas kofaktorius nikotinamido adenino nukleotidas arba jo fosfatas, vandenilio peroksidas nesusidaro (Akal et al., 2018).



2 pav. a. alkoholio dehidrogenazės (ADH) katalizuojama reakcija; **b.** alkoholio oksidazės (AOX) katalizuojama reakcija.

Oksidoreduktazių klasei taip pat priklauso peroksidazės, hidroksilazės, oksigenazės ir reduktazės. Peroksidazės lokalizuotos peroksisomose ir katalizuoja vandenilio peroksido (H₂O₂) utilizaciją. Didžioji dalis peroksidazių savo aktyviajame centre turi hemo grupę ir katalizuoja platų spektrą organinių junginių naudojant vandenilio peroksidą (oksiduojant substratą vandenilio peroksidas verčiamas vandeniu) (Watanabe and Nakajima, 2016) Oksigenazės deguonies molekules iš molekulinio deguonies inkorporuoja į organinius substratus. Gali būti skirstomos į monooksigenazes ir dioksigenazes, dioksigenazių pavyzdys gali būti triptofano-2,3- dioksigenazė, kuri dalyvauja triptofano katabolizme (Jones and Solomon, 2015). Monooksigenazės, dar vadinamos hidroksilazėmis prie substratų prideda hidroksilo grupes, pvz., triptofano hidroksilazė. Šio fermento fiziologinė funkcija hidroksilinti triptofaną (aromatinę amino rūgštį), žinduoliuose tai limituojantis procesas neurotransmiterio serotonino sintezėje (Moran et al., 2000). Reduktazės katalizuoja redukcijos reakcijas, gali veikti ir kaip oksidazės.

1.2 Lakazės

Gausiam oksidazių poklasiui priklauso ir lakazės (benzendiol: deguonies oksidoreduktazė, (EC 1.10.3.2). Jos yra vienos seniausių ir daugiausiai tyrinėtų fermentų, plačiai paplitusios gamtoje. Pirmiausia buvo rasta ir aprašyta Japoniškame lakingame medyje (*Rhus vernicifera*) dar 19-ame amžiuje, tačiau didesnis dėmesys sutelktas į fermentą tuomet, kai jis buvo susietas su medieną ardančiu baltoju pelėsiu.

Lakazės priklauso polifenolinių oksidazių grupei, kataliziniame centre turinčios vario atomų ir paprastai yra vadinamos multivarinėmis oksidazėmis. Katalizuoja įvairių organinių junginių oksidaciją, įskaitant monofenolius, difenolius, polifenolius, aromatinius aminus, ligniną ir policiklinius aromatinius hidrokarbonatus, tuo pačiu redukuojant deguonį iki vandens (Aslam et al., 2012). Daugiausiai egzistuoja kaip monomerai, dimerai ir paprastai yra tarpląsteliniai glikoproteinai, kiekviename monomere turintys po keturis vario atomus (Afreen et al., 2017).

Lakazės plačiai paplitusios aukštesniuose augaluose, grybuose, taip pat buvo rasta vabzdžiuose ir bakterijose (Kunamneni et al., 2008). Augaluose randamos kur kas rečiau nei grybuose. Visų rūšių priklausančių Anacardiaceae šeimai, kuriai priklauso ir lakingasis raugmedis (*Toxicodendron vernicifluum*), sakuose buvo rasta lakazių, tačiau duomenų apie jų aktyvumą kitose augalų rūšyse nėra gausu (Alcalde, 2007). Didžioji dauguma iki šiol aprašytų lakazių yra grybinės, jų aktyvumas nustatytas daugiau nei 60-yje grybų rūšių, priklausančių basidiomicetams, askomicetams ir deuteromicetams, aprašyta beveik kiekvienoje rūšyje, kurioje jos buvo ieškota.

Lac genų reguliacija ir ekspresija skiriasi priklausomai nuo organizmo, ir atspindi tai, kokią fiziologinę funkciją atlieka toje rūšyje (Fonseca et al., 2014). Daug tyrimų yra nukreipta į induktorių paiešką, siekiant padidinti lakazių išėigą. Kai kurie tyrimai rodo, kad lakazės yra indukuojamos, kai pridedama tokių aromatinių junginių kaip vanilino rūgštis, veratrilo alkoholis, ferulo rūgštis, syringaldazinas, ar metalų jonų (Cu^{2+}) (Ikehata et al., 2004), tačiau šis efektas turėtų būti patikrintas su kiekviena konkrečia rūšimi atskirai.

1.3 Paplitimas

1.3.1 Augaluose

Lakazės paplitusios tarp aukštesniųjų augalų, grybų, buvo rasta ir bakterijose bei vabzdžiuose (**3 pav**). Pirmiausia atrasta augaluose, Japoniškame lakingame medyje *Toxicodendron vernicifluum*, prisideda prie lako susiformavimo, iš ko ir kilo pavadinimas (Kaczmarek, 2017). Bendrai augalinės lakazės yra glikoproteinai kurių didelį procentą (20-45%) lyginant su grybinėmis (10-25%) sudaro karbohidratai, kurie yra atsakingi už vario sulaikymą, fermentų stabilumą ir aktyvumą. Dydis svyruoja nuo 60 iki 130 kDa, o izoelektriniai taškai 7,0 – 9,6. Didžioji dalis lakazių yra sekretuojami fermentai. Nors aktyvusis centras labai panašus į grybinių lakazių, tačiau turi kur kas žemesnį redokso potencialą, ir aukštesnį pH optimumą, varijuoją tarp 7.0 – 10.0, kai tuo tarpu grybinių yra rūgštinėje pusėje. Šios savybės iš dalies gali būti susijusios su skirtingomis augalinių ir grybinių lakazių funkcijomis, kadangi viena katalizuoja lignino susidarymą, o kita dalyvauja jo skaidyme. Taip pat yra užfiksuota, kad palaiko ląstelės sienelės struktūrą ir integralumą, dalyvauja žaizdų gijime bei atsake į aplinkos stresus (Wang et al., 2015).

1.3.2 Prokariotuose

Nors yra keletas publikacijų apie lakazių aktyvumą bakterijose, jos nėra dažnos. Į lakazes panašūs bakteriniai fermentai yra viduląsteliniai arba periplazminiai. Turbūt geriausiai iki šiol apibūdinta bakterinė lakazė išskirta iš *Sinorhizobium meliloti*, azotą fiksuojančios bakterijos priklausančios *Rhizobiaceae* šeimai, kuri formuoja simbiotinius ryšius su ankštiniais augalais. Apibūdinta kaip 45 kDa periplazminis baltymas, kurio izoelektrinis taškas yra ties pH 6,2, aktyvumas nustatytas kaip substratą naudojant syringaldaziną. Manoma, kad dalyvauja pigmentacijoje, elektronų transporte, sporuliacijoje, metalų oksidacijoje ir UV bei H₂O₂ atsparume (Rosconi et al., 2005). Be to, buvo identifikuota ir archėjose, pavyzdžiui LccA iš halofilinių archėjų *Haloferax volcanii*, labai termostabili ir dideliu atsparumu druskoms pasižyminti lakazė. Tyrimo metu išgryninti keturi fermentai, kurie visi pasižymėjo aktyvumu tiriant syringaldaziną, todėl padaryta išvada, kad susidarė keturios izoformos, kurios pasikeitė post-transliacinių modifikacijų metu (Uthandi et al., 2010).

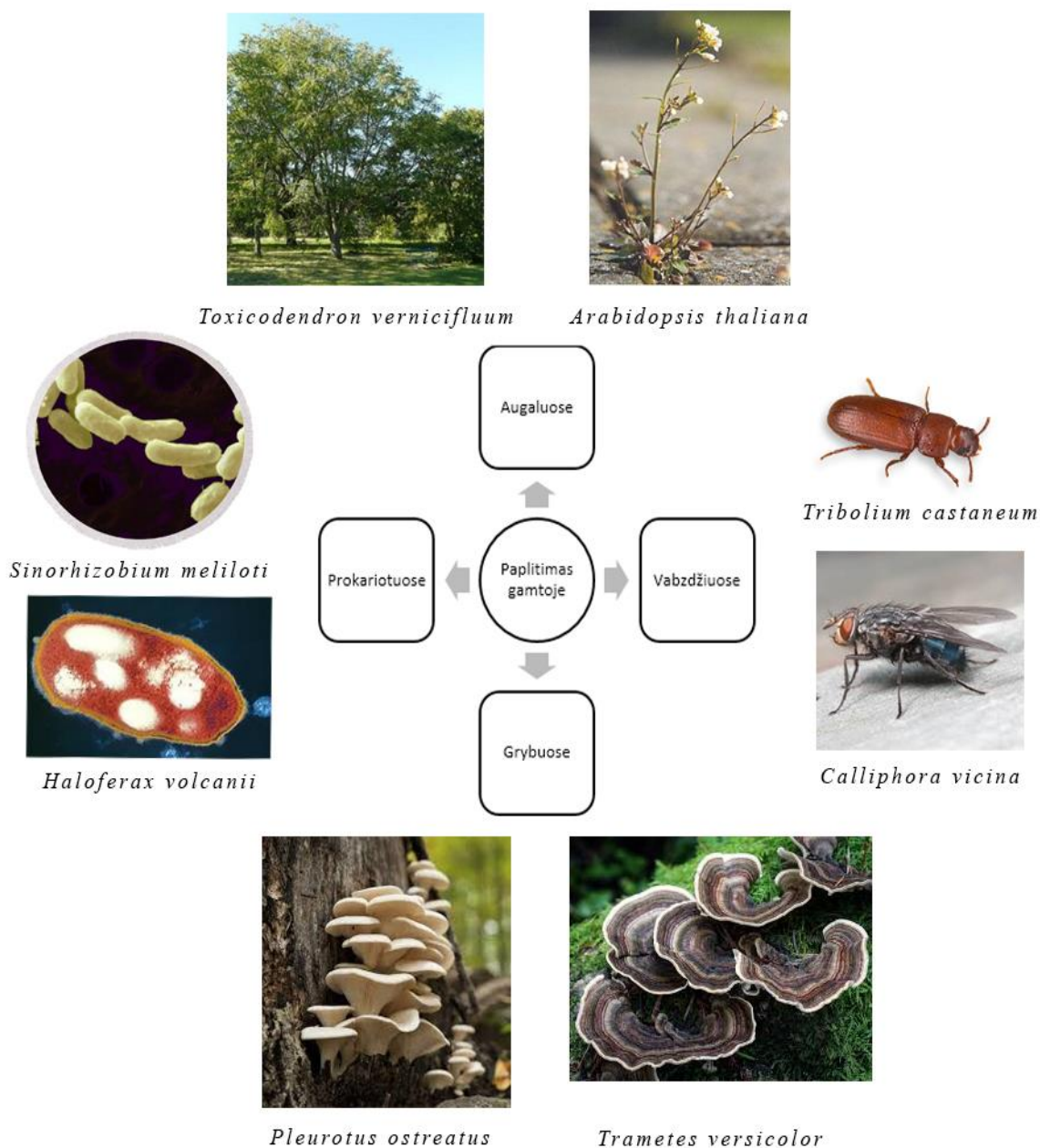
1.3.3 Vabzdžiuose

Manoma, kad vabzdžiuose lakazės dalyvauja kutikulės sklerotizacijoje, kutikulėje oksiduojant katecholius iki chinonų, kurie katalizuoja baltymų kryžminimosi reakcijas. Tai buvo įrodyta mažajame buožiaūsyje milčiuije *Tribolium castaneum*. Lakazė atliko svarbų vaidmenį lervų bei suaugėlių kutikulės pigmentacijoje, katalizavo kutikulinius baltymus sklerotizacijos metu (Niu et al., 2008). Taip pat lakazės buvo rastos ir kitose rūšyse, pvz., *Calliphora*, *Diptera* ir *Drosophila*, kurios dalyvauja sklerotizacijos procese (Kaczmarek, 2017).

1.3.4 Grybuose

Tuo tarpu grybinės lakazės turi daugiau funkcijų, tokių kaip morfogenezę, pigmentacija, atsakas į stresą, lignino degradacija, dalyvauja grybinėje augalų patogenezėje. Lakazių aktyvumas nustatytas daugelyje grybų rūšių ir išgryninta iš daugelio jų. Daugiausiai išskirta ir aprašyta iš filamentinių grybų, priklausančių *Ascomycetes*, *Deuteromycetes* bei aukštesnei *Basidiomycetes* klasėms (Kaczmarek, 2017). Kiek tiksliai grybų produkuoja lakazes pasakyti sunku, kadangi nebuvo atliktas sisteminis tyrimas.

Lakazinis aktyvumas nebuvo užfiksuotas žemesniuose grybuose, tokiuose kaip *Zygomycetes* ar *Chytridiomycetes*, nes nebuvo atlikti išsamūs tyrimai. Kalbant apie mieles, iki šiol šie fermentai buvo išskirti tik iš žmogaus patogeno *Cryptococcus neoformans*. Mielė produkuoja tikrąją lakazę, kuri oksiduoja fenolius ir aminofenolius, ir yra stipriai susijusi su ląstelės sienele ir prisideda prie atsparumo fungicidams (Brijwani et al., 2010).



3 pav. Lakazių paplitimo schema.

1.4 Grybinės lakazės

Dauguma iki šiol tyrinėtų lakazių yra arba viduląstelinės, arba tarpląstelinės, jų lokalizacija susijusi su fiziologine funkcija ir nulemia substratų spektrą (Baldrian, 2006). Dėl lakazių substrato savybių, fermentai dalyvaujantys lignino degradacijoje turi būti išskirtinai užląsteliniai. Nors didžioji dalis jų (apie 95-98%) yra užląstelinės kilmės, kai kurios medžio puvinio grybų lakazės taip pat yra randamos ir ląstelės viduje. Gali būti, kad viduląstelinės grybų lakazės, panašiai kaip ir periplazminės bakterijų lakazės, gali dalyvauti mažų fenolinių junginių transformacijoje ląstelės viduje, o ląstelės sienelėje lokalizuotos, su sporomis susijusios lakazės, prisideda prie svarbių ląstelės sienelės apsaugai junginių formavimosi (Mann, 2009a).

Geriausiai iki šiol ištirtos lakazės iš grybų, priklausančių basidiomicetų grupei, kurie sukelia baltąjį medžio pelėsį (Baldrian, 2006). Bendrai katalizinis aktyvumas ir stabilumas tarp fermentų gali varijuoti priklausomai nuo kilmės, temperatūros, pH, naudotos kultūrinės terpės. Lakazės stabilios pH (3,0-6,0), labai priklauso nuo tiriamo substrato. Gali veikti pakankamai plačiame temperatūriniame intervale (20-55°C), buvo išskirta ir termostabilių fermentų, galinčių veikti (60-70°C) temperatūroje (Saraiva et al., 2012a). Izoformų atsiradimas pastebimas priklausomai nuo grybo augimo fazės, induktorių buvimo ir bendrų auginimo sąlygų. Be to, pastebėta, kad tam tikros rūšies produkuojamos izoformos gali varijuoti savo pI reikšmėmis ir skirtis molekuliniiais dydžiais ir savybėmis (Bertrand et al., 2013).

Lakazės yra holofermentai, jos aktyvi forma gali būti monomerinė, dimerinė ar trimerinė, su keturiais vario atomais kiekviename monomere (**5 pav**) (Imran et al., 2012). Kaip ir dauguma grybinių užląstelinųjų fermentų, lakazės yra glikoproteinai, turintys apie 10-30% karbohidratinio turinio (Baldrian, 2006). Glikozilinimo laipsnis svarbus sekrecijoje, proteoliziniam stabilumui, gebėjimui išlaikyti vario jonus ir termostabilumui. Taip pat manoma, kad atlieka svarbų vaidmenį nulemiant fermentų izoformų pI reikšmes (Bertrand et al., 2013), jos gali varijuoti tarp 3-7.

Daugelyje tirtų grybų buvo rasta daugiau nei viena izoforma. Kai kurios rūšys geba sintetinti platų izofermentų spektrą, pavyzdžiui, buvo nustatyta, kad baltasis pelėsis *P. ostreatus* sintetina net 8 izoformas, iš kurių 6 buvo išskirtos ir ištirtos (Giardina et al., 1999). Tai susiję su adaptacija prie įvairių aplinkos sąlygų, siekiant užtikrinti optimalų fermento veikimą. Kai kurios grybų rūšys produkuoja izofermentus labai panašius tiek struktūriškai, tiek katalizinėmis savybėmis. Tačiau taip pat yra skirtingų autorių užfiksuotos lakazės iš tos pačios rūšies, su skirtingomis savybėmis, kas ir gali būti paaiškinama skirtingomis auginimo sąlygomis, ko pasekoje sintetinės skirtingos fermento izoformos. Šie fermentai paprastai skiriasi savo kinetinėmis savybėmis, pavyzdžiui turi skirtingas K_M reikšmes, pH optimumus, optimalią temperatūrą (Bertrand et al., 2013), todėl dažnai būna sunku išgryninti grybinių lakazių individualius izofermentus. Iš pradžių buvo manyta, kad skirtumai atsiranda dėl post transliacinių modifikacijų variacijų viename gene. Tačiau pastebėta, kad įvairios grybų rūšys turi daugiau nei vieną geną koduojantį lakazes. *Agaricus bisporus* rasti du genai, trys genominės sekos pastebėtos *Pleurotus ostreatus*, trys lakazių izoformos rastos *T. versicolor*, keturios skirtingos mRNR sekos rastos *Rhizoctonia solani*, ir penkios *Tametes villosa* (Bertrand et al., 2013, ir cituojami straipsniai). Taigi, pakankamai didelė lakazių izoformų įvairovė atsiranda dėl nemažos jas koduojančių genų įvairovės, taip pat jų regulacija gali skirtis, priklausomai nuo rūšies. Atliekant tyrimus su *Pleurotus ostreatus* buvo pastabėta, kad be vieno, visomis sąlygomis gausiausiai sintetinamo fermento POXC, egzistuoja dar trys izoformos (POXA1A, POXA1b ir POXA2), dvi iš jų buvo išgrynintos ir apibūdintos. Išgrynintos izoformos

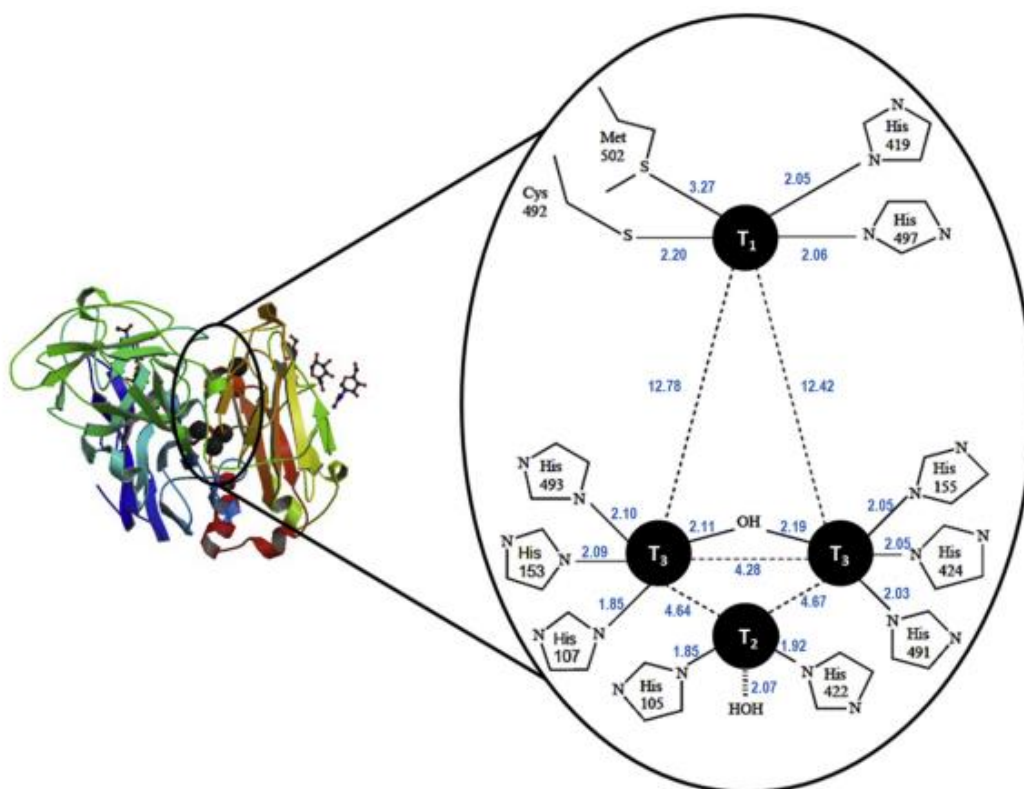
turėjo skirtingas pI reikšmes (4.1 ir 4.3), vienodą molekulinę masę – 56 kDa. Sugerties spektro pikas ties 600 nm ilgio banga rodo, kad tai mėlynosios lakazės. Tarp dviejų izoformų didelių struktūrinių ir kinetinių skirtumų nepastebėta, tik vienas fermentas šiek tiek ilgiau išlaiko stabilumą žemesniame pH (Palmieri et al., 2003). Tiriant kitą basidiomicetą *Pleurotus nebrodensis* buvo sėkmingai išgrynintos trys lakazių izoformos (Lac1, Lac2 ir Lac3) ir ištirtos jų kai kurios biocheminės savybės. Nors visų izoformų aktyvumas prie skirtingų temperatūrų ir pH (pH optimumas visoms izoformoms 3.0) buvo labai panašus, tačiau jų termostabilumas labai skyrėsi, Lac2 buvo stabiliausia, o mažiausiai stabili Lac3, temperatūroje nuo 30°C iki 70°C. Visos izoformos vienodai oksidavo ABTS ir visai neoksidavo vanilino rūgšties, tačiau išsiskyrė substratiniu specifiškumu, pavyzdžiui oksiduojant kavos rūgštį, Lac3 pasižymėjo net apie 65% ir 96% didesniu aktyvumu už Lac1 ir Lac2 atitinkamai. Naudojant kitą substratą – katecholį – aktyvumai taip pat skyrėsi, Lac1 pasižymėjo 7% ir 57% didesniu aktyvumu už Lac2 ir Lac3 atitinkamai (Yuan et al., 2015).

Lakazės gali labai skirtis savo katalizinėmis savybėmis. Jas būtų galima sugrupuoti į tris grupes, atsižvelgiant į jų redokso potencialą. Pirmajai grupei priklauso fermentai su žemu redokso potencialu (<460mV), išskirti iš augalų, vabzdžių ir bakterijų. Antrajai su vidutiniu redokso potencialu (apie 470-700mV), išskirti iš *Ascomycota*, kai kurių bakterijų ir *Basidiomycetes*. Trečiajai priklauso lakazės su dideliu redokso potencialu (700-800mV). Šiai grupei priklauso fermentai išskirti iš *Basidiomycetes* daugiausiai baltojo pelėsio grybų (Kaczmarek, 2017).

1.5 Lakazės struktūra

Savo kataliziniame centre lakazės dažniausiai turi keletą vario atomų, todėl yra vadinamos multivarinėmis oksidazėmis. Vario atomai yra trijų tipų: T1, T2 ir T3, aktyviajame centre sudaro tribranduolį klasterį, dalyvauja deguonies redukcijoje ir vandens produkcijoje (**4 pav**).

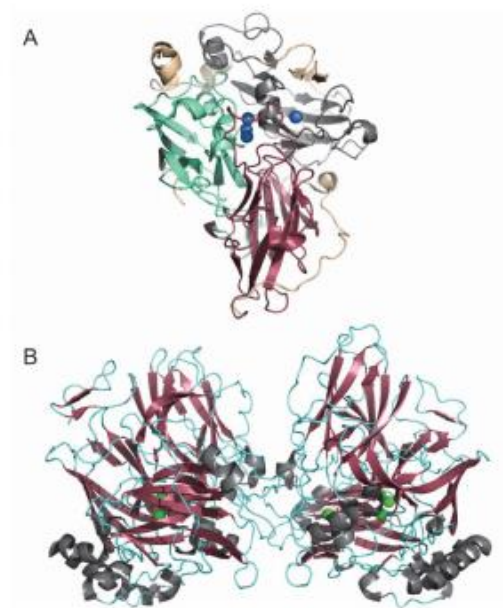
Pirmo tipo vario atomas yra atsakingas už tipišką mėlyną spalvą ir sugeria šviesą 610 nm bangoje. Jis yra netoli substratą prijungiančio centro, ir yra atsakingas už substrato oksidaciją. T1 yra apsuptas keturių ligandų, kurie ir nulemia oksidaciją potencialų intervale 430-780 mV. Trys iš tų ligandų yra konservatyvūs – du histidino ir vienas cisteino ir šiek tiek silpnesnis ligandas aksialinėje pozicijoje, dažniausiai metioninas (Zucca et al., 2016). Būtent nuo cisteino ir vario kovalentinės sąjungos ir matoma mėlyna spalva (Mann, 2009b). Antro ir trečiojo tipo atomai dalyvauja fermento inhibicijoje, kadangi reaguoja su anijonais, tokiais kaip fluoridas ar cianidas. Kartu jie suformuoja tribranduolį klasterį fermente. Šis T2/T3 klasteris susijęs su T1 atomu konservatyviu His-Cys-His tripeptidu ir katalizuoja O₂ redukciją iki vandens, per keturių elektronų grandinę. Klasteris apsuptas aštuonių histidino ligandų (Mann, 2009b).



4 pav. Lakazės aktyvusis centras. Trimatė *Coriolus zonatus* 2HZH lakazės struktūra gauta iš Protein Data Bank (PDB).

Lakazės, kuriose nėra pirmo tipo vario atomo arba vietoje vario yra cinko ar geležies atomai, vadinamos geltonosiomis arba baltosiomis lakazėmis. Geltonosios neturi T1 vario ir būtent dėl šios priežasties šviesą sugeria 320-340 nm bangų ilgyje (Ike et al., 2015). Šiuo metu nėra daug informacijos apie geltonųjų lakazių gryninimą ir jų katalizines savybes, tačiau yra užfiksuota nemažai grybų rūšių, kurios jas produkuoja, pavyzdžiui bazidiomicetas *Stropharia aeruginosa* (Daroch et al., 2014). Baltosios turi vienintelį vario atomą, ir jose taip pat nėra stebima sugertis 610 nm, nei 330 nm bangoje, tačiau turi piką ties 400 nm bangos ilgiu, dėl to, kad jose aptinkami cinko, geležies ar mangano atomai. Spalvos nebuvimas gali būti dėl vario atomo valentingumo pokyčio. Nors nėra multivarinės oksidazės, tačiau priskiriamos lakazių šeimai dėl to, kad jų struktūra identiška jau žinomoms lakazėms, be to jos naudoja deguonį kaip oksidacijos substratą ir reakcijos pabaigoje kaip produktas nesusidaro vandenilio peroksidas. Aprašytos kelios rūšys, produkuojančios baltas lakazes, pavyzdžiui *Pleurotus ostreatus*, *Myrothecium verrucaria* kurių fermentai, be tipinio vario atomų turi ir kitų įvairių metalų atomų (Agrawal et al., 2018).

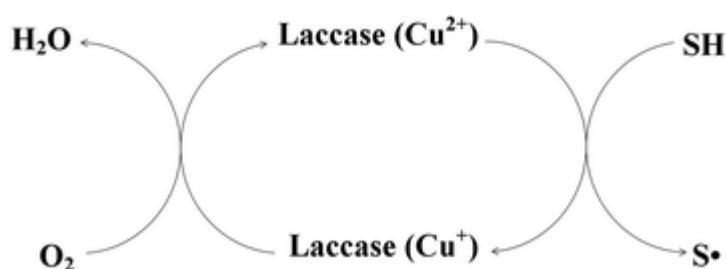
Trimatės grybinių lakazių struktūros jau buvo nustatytos šiose rūšyse: *Coprinus cinereus*, *T.versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Melanocarpus albomyces*, *Rigidoporus lignosus*. Visos jos panašios struktūros, susideda iš trijų nuosekliai išsidėsčiusių β -statinių tipo struktūrų, susijusių su mažais mėlynosio vario baltymais, tokiais kaip azurinas ir plastocianinas (Wong, 2009).



5 pav. (A) Monomerinė *T. versicolor* 1GYC lakazė, pažymėtais domenais, 1 domenas žalias, 2 – raudonas, 3 – pilkas (vario atomai pažymėti mėlynai). (B) Dimerinė *M. albomyces* 2Q9O lakazė, vario atomai pažymėti žaliai.

1.6 Veikimas

Lakazių katalizė vyksta dėl vienos deguonies molekulės redukcijos iki vandens, kartu oksiduojant viena elektroną iš plataus spektro aromatinių junginių, į kuriuos įeina polifenoliai, monofenoliai bei aromatiniai aminorai (**6 pav**). Lakazės turi keturis vario atomus, skirstomus į pirmąjį – T1, prie kurio jungiasi redukuojamas substratas, ir tribranduolį T2/T3 klasterį, kur vyksta deguonies redukcija iki vandens (Shraddha et al., 2011).

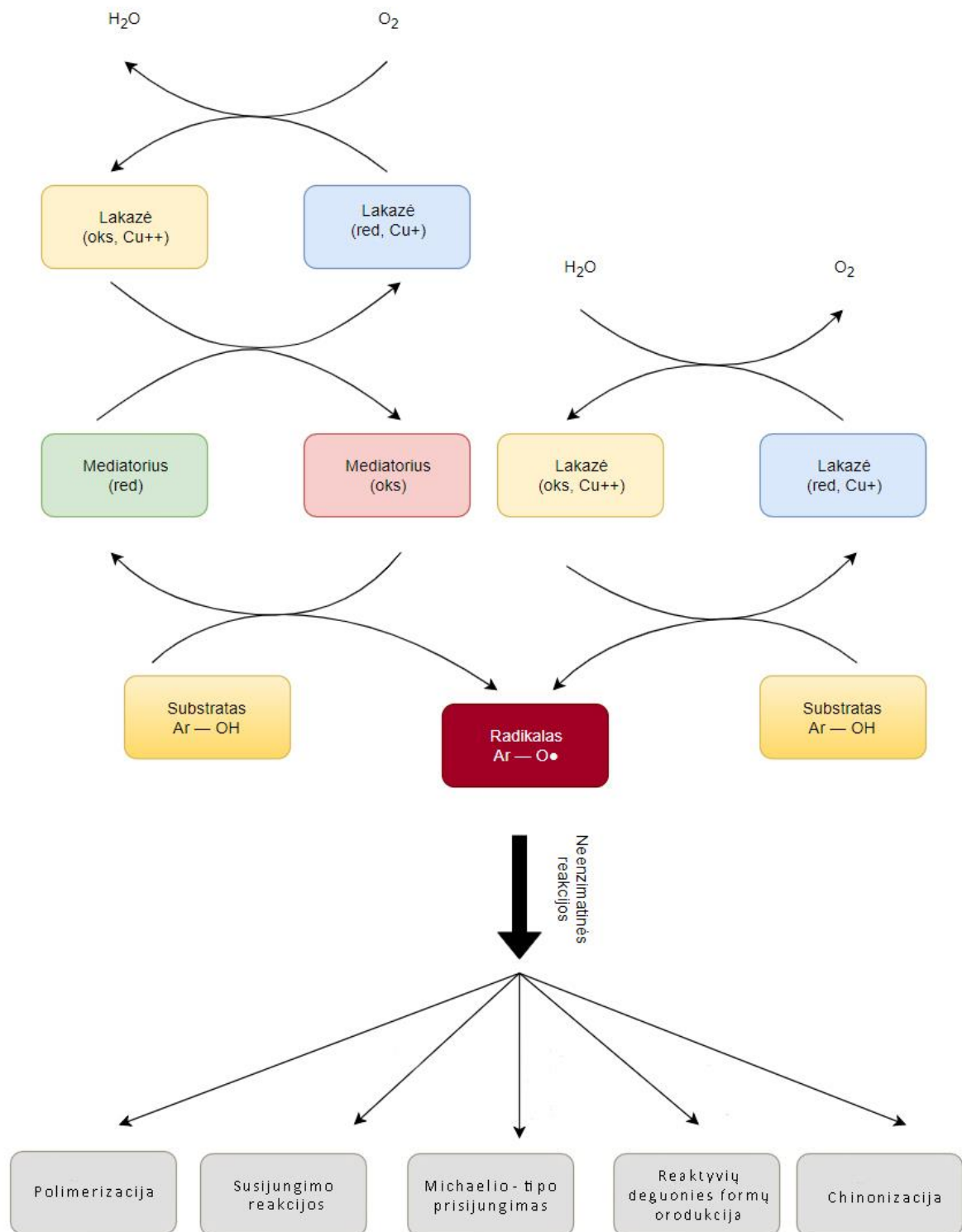


6 pav. Bendra lakazių veikimo diagrama (SH – redukuotas substratas, S• - oksiduotas substratas) (Plácido and Capareda, 2015).

Trumpai, katalizė vyksta trimis etapais: (1) pirmojo tipo vario atomo redukcija substratu, (2) elektronas pernešamas nuo pirmojo tipo vario atomo, prie antrojo ir trečiojo tipo atomų trinuklearinio klasterio, (3) trinukleariniame klasteryje deguonis redukuojamas iki vandens (Brijwani et al., 2010). Pirmiausiai nuo fenolinio substrato hidroksilinės grupės atpalaiduojamas

protonas ir suformuojamas fenoksilo tipo radikalas. Tuo pačiu metu, vienas laivas elektronas reaguoja su T1 vario atomu ir redukuoja jį iš natyvios Cu^{2+} formos iki Cu^+ . Suformuotas fenoksilo radikalas, gali būti toliau oksiduojamas iki chinono arba dalyvauti nefermentinėse reakcijose, tokiose kaip hidrogenizacija, polimerizacija (Madhavi and Lele, 2009). Substrato oksidacijos metu, gauti elektronai nuo T1 vario atomo yra perkeliama į tribranduolį T2/T3 klasterį, fermentas iš stacionarios formos virsta aktyvia forma. Pilnai vario atomų redukcijai aktyviame lakazės centre, turi įvykti keturios vieno elektrono oksidacijos reakcijos (Alcalde, 2007). Katalizinės reakcijos limituojantis žingsnis nėra elektrono perkėlimas nuo substrato ant T1 vario atomo, o vidumolekulinis elektrono perkėlimas nuo T1 atomo ant tribranduolio vario klasterio (Kaczmarek, 2017). Deguonies redukcija vyksta dviem etapais. Deguonis prisijungia prie klasterio susiformuojant tarpininkams: pirmiausia deguonies molekulė prisijungia prie T2/T3 saito, du elektronai pašalinami nuo T3 vario ir susiformuoja peroksido tarpininkas. Peroksidas susijungia su oksiduotu T3 ir redukuotu T2 centru. Lėtas tarpininko pašalinimas inicijuojamas paskutinio elektrono perkėlimo nuo T2 vario atomo, ir pagreitinamas krentančio pH, karboksilinės rūgšties protonizacijos šalia aktyviojo centro. Paskutiniame žingsnyje, visi keturi vario atomai yra oksiduoti, ir O^{2-} paleidžiamas, kaip vandens molekulė (Wong, 2009).

Lakazių katalizė gali būti išplečiama ir nefenoliniams substratams, pridedant mediatorių. Mediatoriai tai grupė mažos molekulinės masės organinių junginių, kurie gali būti oksiduojami lakazių, ir suformuojantys aktyvius katijoninius radikalus, gebančius oksiduoti nefenolinius junginius, kurių pati lakazė oksiduoti negali (Brijwani et al., 2010). Tai yra dviejų pakopų procesas, iš pradžių fermentas katalizuoja tarpininko oksidaciją, o tada oksiduotas tarpininkas oksiduoja substratą (**7 pav**). Mediatorius turėtų atitikti tam tikras savybes: jo paties oksidacija turėtų vykti be trukdžių, būti stabilus, neslopinti fermentinės reakcijos, ir jo konversija turėtų būti ciklinė (Agrawal et al., 2018).



7pav. Lakazės veikimo schema

1.7 Gryninimas

Augalinės lakazės išskiriamos iš audinių ar audinių skysčių mėginių, tuo tarpu grybinės užląstelinės lakazės gryninamos iš kultūrinės terpės. Dažniausiai naudojamos įvairios baltymų gryninimo technologijos. Į tipinius gryninimo protokolus įeina ultrafiltracija, jonų mainų chromatografija, gelfiltracija, hidrofobinė sąveika bei kitos elektroforetinės ir chromatografinės technologijos (Madhavi and Lele, 2009).

Vieno etapo lakazės gryninimas iš *Neurospora crassa* vyksta naudojant „Celite“ kolonėlinę chromatografiją, gauta lakazė su 333 U mg^{-1} aktyvumu. Lakazė iš LLP13 pirmiausia gryninta kolonėlėje, tada gelfiltracijos metodu. Lakazė iš *T. versicolour* gryninta naudojant etanolio precipitaciją, DEAE-sefarozę, fenil-sefarozę, ir Sephadex G-100 chromatografiją, gauta lakazė su $91,443 \text{ U mg}^{-1}$ aktyvumu (Shraddha et al., 2011 ir cituojami straipsniai).

1.8 Induktorių įtaka lakazių produkcijai

Nors lakazių biologinės savybės ir praktinis jų taikymas sudomino daug mokslininkų, tačiau pramoniniam naudojimui jų natūrali gamyba yra nepakankama. Todėl dėmesys sutelkiamas lakazių biosintezės optimizavimui. Sintezę ir sekreciją nulemia daugelis faktorių, įskaitant maisto medžiagas, kultivavimo sąlygas, pridamus induktorius, pH, temperatūrą (Zhu et al., 2016). Dažniausiai naudojami anglies šaltiniai gliukozė, manozė, maltozė, fruktozė ir laktozė. Mielių ekstraktas, peptonas, šlapalas, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ir NaNO_3 dažniausiai naudojami azoto šaltiniai (Shraddha et al., 2011). Iki šiol atlikti tyrimai parodė, kad produkcija stipriai priklauso nuo anglies/azoto santykio terpėje, kiekvienai rūšiai individualiai (Giardina et al., 2010). Dauguma tyrimų rodo, kad optimali lakazių produkcijai temperatūra varijuoja tarp $25\text{--}30^\circ\text{C}$ laipsnių (Pointing et al., 2000), o tinkamiausias pH tarp 4,5 ir 6,0 (Shraddha et al., 2011).

Tiriant *Phlebia brevispora* BAFC 633 fermentus ir siekiant padidinti jų išeigą, į auginimo terpę buvo įmaišoma įvairių aromatinių junginių ir stebima jų įtaka biomasės augimui ir baltymo sekrecijai. Pridėjus ferulo rūgšties, gvajakolio, syringo rūgšties buvo matomi nežymūs grybo biomasės prieaugio pakitimai, tačiau sekretuojamų baltymų kiekis nepakito. Į augimo terpę pridėjus vanilino padidėjo ir biomasė ir sekrecija, o naudojant kavos rūgštį, padidėjo tik baltymų sekrecija. Tame pačiame tyrime stebėta ir metalų jonų įtaka, buvo pridėta AgNO_3 , CuSO_4 , MnSO_4 ir CaCl_2 . Sidarbo nitratas drastiškai sumažino micelio augimą, varis ženkliai padidino, o likusios druskos reikšmingos įtakos augimui neturėjo (Fonseca et al., 2014). Kitų autorių tyrimuose, *P. ostreatus* lakazes indukavo ne tik vario jonai, tačiau produkciją patrigubino ir du toksiniai metalai - Cd^{2+} ir Pb^{2+} . Kitų metalų (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} ir Fe^{3+}) pridėjimas, taip pat reikšmingos įtakos neturėjo (Zhu et al., 2016).

Teigiama induktorių įtaka užfiksuota ir tiriant basidiomiceto *Trametes versicolor* auginimą į terpę pridedant veratrilo alkoholio, ksilidino ir lignosulfonatų. Visi jie ženkliai padidino baltymo produkciją ir aktyvumą lyginant su kontrole. Geriausias induktorius ksilidinas, lakazės aktyvumą padidino beveik 8 kartus (Saraiva et al., 2012b). Kitame darbe buvo tiriama *Pycnoporus sanguineus* lakazių produkcijos priklausomybė nuo azoto šaltinio. Gauti rezultatai parodė, kad fermentų sintezė stipriai priklauso nuo naudojamo azoto šaltinio, geriausi rezultatai pasiekti naudojant mielių ekstraktą, buvo stebimas virš 30 U/L aktyvumas, kituose mėginiuose su šlapalu, gautas aktyvumas mažesnis už 1,6 U/L (Hernández et al., 2015). Amino rūgščių bei vitaminų pridėjimas taip pat padidino produkciją kai kuriose grybų rūšyse. Iš 23 tirtų amino rūgščių su *Cyathus bulleri* lakaze, D,L-metioninas, D,L-triptofanas, glicinas, D,L-valinas, biotinas, riboflavinai ir piridoksino hidrochloridas davė teigiamus rezultatus (Ikehata et al., 2004).

1.9 Faktorių įtaka aktyvumui

Nors nemažai junginių veikia lakazes teigiamai ir indukuoja jų gamybą, tačiau taip pat yra ir daug medžiagų, kurios mažina aktyvumą. Optimalus lakazių veikimui pH labai priklauso nuo naudojamo substrato. Fenoliniams junginiams optimumas varijuoja nuo 3,0-7,0 grybinėms lakazėms ir net iki 9,0 augalinėms (Madhavi and Lele, 2009). Įprastai grybinių lakazių pH optimumas stebimas (nustatomas) labiau rūgštinėje terpėje. ABTS oksidacijos optimumas dažniausiai žemiau už 4,0, fenoliniams junginiams, tokiems kaip DMP, syringaldazinas apie 4,0-7,0, hidrochinonui ir katecholiui tarp 3,5-6,0 (Shleev et al., 2004). Bifazinis pH fenolinių substratų profilis yra pasekmė dviejų priešingų efektų: pirmas generuojamas redokso potencialo skirtumo tarp substrato ir T1 vario atomo. Fenolio redokso potencialas (E_0) mažėja, kai pH didėja dėl protonų atpalaidavimo oksidacijos metu. Kitas efektas susijęs su tiesiogine inhibicija, fermento aktyvumas aukštesniame (šarminiaame) pH krenta, dėl hidroksido prisijungimo prie T2/T3 centro, ir trukdo vidinę elektronų pernašą nuo T1 ant T2/T3 (Baldrian, 2006). Optimali temperatūra labai priklauso nuo fermentą produkuojančios rūšies. Lakazės išskirtos iš *Ganoderma lucidum* temperatūrinis optimumas stebimas ties 20-25°C temperatūra, o stabili lakazė išlieka 10-50°C temperatūrų intervale (Madhavi and Lele, 2009).

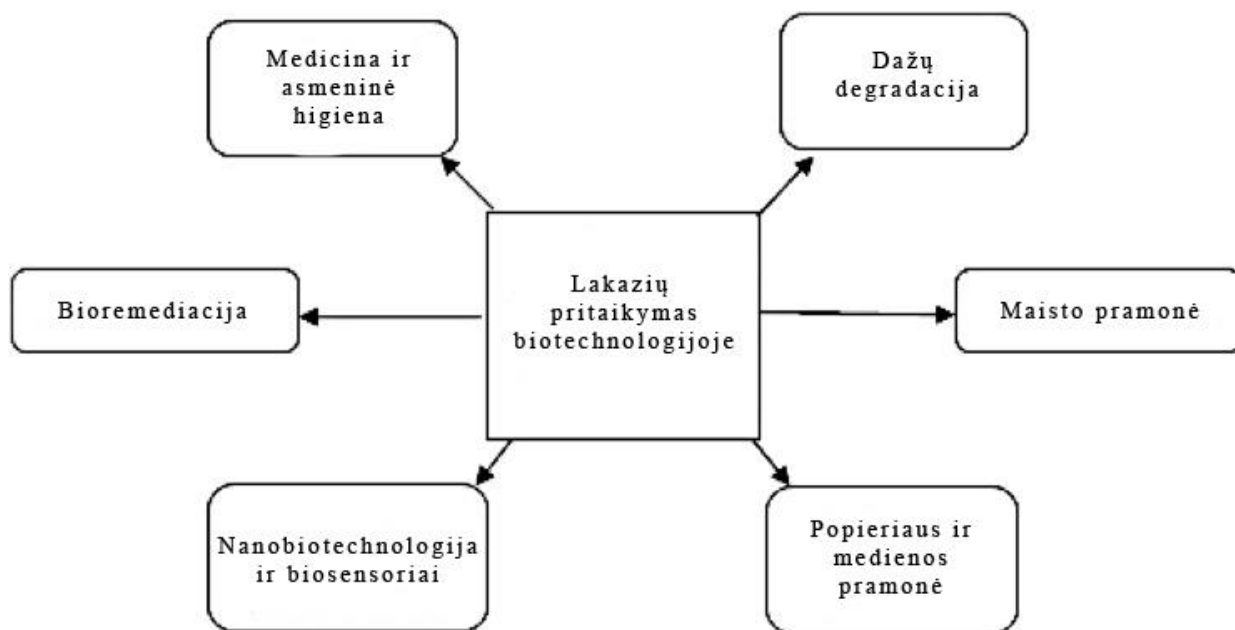
Kaip ir kitas metalų turinčias oksidazes, lakazes inhibuoja įvairios cheminės medžiagos. Maži anijonai, tokie kaip azidai, halidai, cianidai, tiocianidai, fluoridai ar hidroksidai jungiasi prie pirmo arba antro tipo vario atomo, ko pasekoje sutrinkdomas vidinis elektrono perdavimas ir inhibuojamas veikimas. Kiti inhibitoriai, tokie kaip metalų jonai, riebalų rūgštys, hidroksilglicinas, detergentai galimai modifikuoja amino rūgštis, sukelia konformacinius pokyčius arba cheluoja vario jonus (Polaina and MacCabe, 2007). Atsižvelgiant į tai, kad lakazės natūraliai atsiranda dirvožemyje, reikėtų atkreipti dėmesį į atsparumą sunkiesiems metalams. Baltojo pelėsio *Perenniporia tephora*

lakazę paveikus 100 mmol/l Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mo^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Li^{+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} ir Al^{3+} metalų anijonais, beveik visi mažino fermentinį aktyvumą, stipriausiai veikė Cd^{2+} ir Al^{3+} , iki 90%, mažiausiai magnio jonai. Inhibicinio poveikio neturėjo tik vario ir ličio jonai, aktyvumas netgi padidėjo (Ben Younes et al., 2007). Tyrime su *Pleurotus sp.* grybine lakaze, jos aktyvumą labiausiai mažino cinko jonai, taip pat pridėjus Mn^{2+} ir Fe^{2+} aktyvumas krito beveik 60%. Mažiausiai įtakos darė Cu^{2+} , Ba^{2+} ir Mg^{2+} jonai, nei vienas iš tirtų metalų aktyvumo nepadidino (More et al., 2011).

T. versicolor lakazių aktyvumo tyrime, naudojantis standartiniais testais patikrinta dažniausiai naudojamų inhibitorių įtaka. Fermentas apie 2 minutes inkubuotas su inhibuojančiu junginiu (cisteinu, DTT, DCC, TGA, NaN_3) ir matuojamas liekamasis aktyvumas. Tyrimo rezultatai parodė, kad tik natrio azidas turėjo stiprų inhibicijos poveikį (Johannes and Majcherczyk, 2000). O *Cladosporium cladosporioides* lakazė pasirodė jautresnė šioms medžiagoms, pridėjus po 10mmol/l DTT, NaN_3 ir cisteino, buvo pasiekta 100% inhibicija. Mažai aktyvumą veikė SDS ir EDTA, liekamasis aktyvumas siekė beveik 90% pradinio (Aslam et al., 2012).

1.10 Panaudojimas

Lakazės, skirtingai nei peroksidazės, nereikalauja antro substrato, nes jos antrasis substratas – deguonis – paprastai būna aplinkoje. Dauguma lakazių yra tarpląsteliniai fermentai, todėl labai lengvai išgryninamos ir nesunkiai atliekamos valymo procedūros, taip pat paprastai pasižymi dideliu stabilumu užląstelinėje aplinkoje (Baldrian, 2006). Fermentą lengva gauti iš grybų, kuriuos nėra sunku užsiauginti laboratorinėmis sąlygomis, fermento produkcija gali būti indukuojama. Grybai yra efektyviausi producentai, kadangi lakazės turi aukščiausią redokso potencialą lyginant su bakterinėm ar augalinėm lakazėm (+800mV) (Brijwani et al., 2010), todėl daugiausiai naudojami biotechnologijoje. Naudojama maisto, kosmetikos, popieriaus, tekstilės pramonėje, aplinkos teršalų biotransformacijoje, bioremediacijoje, biosensorių gamyboje, organinėje sintezėje (8 pav).



8 pav. Lakazių panaudojimo biotechnologijoje sričių schema (Upadhyay et al., 2016).

1.10.1 Biodegradacija

Šiuo metu didelė problema, kad mūsų aplinka labai užteršta įvairiomis ksenobiotinėmis medžiagomis. Kai kurios cheminės medžiagos yra kancerogeninės ar mutageninės. Fermentų naudojimas aromatiniais teršalais pašalinti laikomas ekonomišku ir efektyviu metodu. Šiuo metu lakazės naudojamos chlorfenolių, policiklinių aromatinių angliavandenilių, su ligninu susijusių struktūrų, organinių fosforo junginių, fenolių ir azo dažų bioremediacijoje. Taip pat naudojamos įvairių pramonės šakų (maisto, tekstilės, popieriaus, plastiko) išleidžiamų nuotekų detoksifikacijoje (M. Rivera-Hoyos et al., 2013). Jos teršia aplinką dažais, kurie dėl savo cheminės struktūros yra atsparūs irimui. Kadangi įprastinės dažų apdorojimo sistemos yra brangios ir sunaudoja daug cheminių medžiagų, biologinis valymas yra veiksminga alternatyva. Lakazių gebėjimas blukinti dažus yra plačiai tiriamas, jos skaldo t.y. oksiduoja tokius dažus kaip triarilmetanas, indigo, azo bei antrachinoniniai dažikliai (Abadulla et al., 2000). Fermentai dėl savo specifškumo skelia tik dažų molekules, dėl ko dažymo priedai ir pluoštai lieka nepažeisti (Shraddha et al., 2011). Tai leidžia veiksmingai šalinti iš aplinkos kenksmingas medžiagas, taip pat, dėl tos pačios priežasties yra naudojamos tekstilės pramonėje audiniams blukinti. Privalumai mažesnė kaina, mažesnės vandens ir energijos sąnaudos, aplinka neteršiama kitais chemikalais. Lakazės naudojamos ir popieriaus gamyboje, siekiant padidinti jo su tvirtumu susijusias savybes, pašalina iš popieriaus lignino likučius bei jį balina (Virk et al., 2012).

1.10.1 Maisto pramonė

Maisto pramonėje lakazės naudojamos vaisių sulčių gamyboje, jos užtikrina jų spalvos palaikymą, apsaugo nuo natūralaus parudavimo, kuris atsiranda dėl vaisiuose esančių įvairių fenolių (Brijwani et al., 2010). Duonos gaminimo metu, lakazės naudojamos kaip priedas skoniu, tekstūrai gerinti. Pridėjus fermento į tešlą sutvirtinamos gliuteno struktūros, dėl ko padidinama apimtis, minkštumas, sumažinamas lipnumas. (Madhavi and Lele, 2009) Taip pat naudojama vyno ir alaus gamyboje, drumstumui mažinti bei stabilumui palaikyti (Imran et al.).

1.10.2 Biosensoriai

Naudojant vieną ar fermentų sistemą galima sukurti biologinius sensorius. Jis gali būti apibrėžiamas kaip analitinis įtaisas, kuriame biologinės medžiagos (fermentai, ląstelės, mikroorganizmai, audiniai ir t.t.) su atitinkamu transduktoriumi (optiniu, elektrocheminiu, kalorimetriniu ir t.t.) gali suteikti selektyvią/kiekybinę analitinę informaciją (Agrawal et al., 2018). Nors įvairiems fenoliniams teršalams nustatyti jau egzistuoja įvairios spektrofotometrinės ir chromatografinės technologijos, tačiau bioanalizė yra selektyvesnė, greitesnė bei pigesnė (Rodríguez-Delgado et al., 2015). Kadangi lakazės geba katalizuoti vieno elektrono perkėlimo reakciją be jokių papildomų kofaktorių, pradėtas tyrinėti jų panaudojimas biosensorių gamybai, įvairiems fenoliniams junginiams, deguoniui, azidams, morfinui, kodeinui, katecholaminams, flavanoidams aptikti (Rodríguez Couto and Toca Herrera, 2006).

1.10.3 Farmacijos sektorius

Daugelis lakazių produktų yra antimikrobiniai, detoksikuojantys arba aktyvūs asmens priežiūros agentai. Jos gali būti naudojamos sudėtingų medicininių junginių sintezei, tokių kaip anestetikai, priešuždegiminiai antibiotikai ir t.t., tokie kaip vinblastinas, mitomicinas, penicilino X dimeras, cefalosporinas (Kunamneni et al., 2008). Vienas iš potencialių lakazės pritaikymo tai *in situ* jodino, reagento plačiai naudojamo kaip dezinfektorius, gamybai (Madhavi and Lele, 2009). Taip pat buvo užfiksuota, kad lakazė turi reikšmingą ŽIV-1 atvirkštinės transkriptazės slopinamąjį aktyvumą (Xu et al., 2012), be jos virusas negali nurašyti savo genetinės medžiagos nuo RNR į DNR. Taip pat lakazės turi potencialo būti naudojamos kosmetikoje, pvz., lakazių pagrindu pagaminti plaukų dažai yra lengviau pagaminami ir mažiau erzina odą, nei dabartiniai dažai (Rodríguez Couto and Toca Herrera, 2006). Taip pat ji dedama į dermatologinius preparatus odai šviesinti, į dezodorantus ir kitus higienos produktus tokius kaip dantų pasta, burnos skalavimo skystis, muilas ir sauskelnės, dėl antimikrobinio poveikio bei gebėjimo skaidyti nemalonius kvapus sukeliančius junginius (Kunamneni et al., 2008).

1.10.4 Organinė sintezė

Pastaruoju metu didėja susidomėjimas panaudoti lakazę kaip biokatalizatorių organinėje sintezėje, kadangi švelniomis aplinkai sąlygomis katalizuoja ryšių susidarymą ir biotransformaciją (Wellington, 2014). Ji naudojama polimerų produkcijai be H_2O_2 naudojimo (Kobayashi and Higashimura, 2003). Lakazės jau pritaikytos polimerinių plėvelių, akrilamido, įvairių amino ir fenolinių junginių polimerizacijai, įvairių funkcinių organinių junginių sintezei, įskaitant polimerus turinčius specifinių mechaninių/elektrinių/optinių savybių, tekstilės dažus, kosmetinius pigmentus, kvapiąsias medžiagas ir pesticidus (Kunamneni et al., 2008).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Auginimas

Lakazes produkuojantis grybas *Didymocrea sp.* J6-1 buvo paimtas iš MMBS grybų kolekcijos, grybinė kultūra buvo palaikoma ant agarizuotos terpės: salyklo ekstraktas 20,0 (g/l), mielių ekstraktas 4,0 ir agaras 15,0; kambario temperatūroje .

Paruoštas inokuliatas užsėjus 1 cm² dydžio grybo micelio gabaliukus nuo agarizuotos terpės į kolbutes su 50 ml inokulianto terpės ir auginta aeruojant 3 paras 30°C temperatūroje terpėje: 3,5 (g/l) salyklo ekstraktas, 2,5 mielių ekstraktas, 0,5 MgSO₄, 2,0 KH₂PO₄, gliukozė 8,0, pH apie 5,5-6,0. Sėta grybo suspensijos iš 50 ml inokulianto kolbutės po 12 ml /500 ml terpės. Auginta aeruojant kolbose su 500 ml terpės 3 paras 30 °C temperatūroje. Auginimo terpė 3,5 salyklo ekstraktas, 2,5 mielių ekstraktas, 0,5 MgSO₄, 1,0 KH₂PO₄, 8,0 (g/l) gliukozė, 0,2 mM Cu²⁺, pH 6,8-7,0.

2.2 Gryninimas

Po auginimo grybo micelis filtruotas, smulkūs micelio fragmentai atskirti centrifuguojant 3000 aps/min greičiu. Į klampų kultūrinį skystį įpilta 20 ml/l terpės superQ Toyopearl 650 M anijonito ir maišant ledo vonioje lakazės sorbuotis ant sorbento nuolat matuojant aktyvumą, kol kultūriniame skystyje neliks lakazinio aktyvumo. Sorbentas atskirtas centrifuguojant 3000 aps/min greičiu, praplaunamas 2 mM K-P buferiu pH 7,0 ir supilamas į kolonėlę.

Vykdyta jonų mainų chromatografija, fermentai eliuuoti 2,0 mM – 500 mM K-P buferio pH 7,0 gradientu. Frakcijos su lakaziniu aktyvumu surinktos ir dializuotos 1,0 mM K-P buferyje pH 7,0. Phenyl Sepharose 6 Fast Flow kolonėlė sulygsvarinta 1,0 M amonio sulfatu 2,0 mM K-P buferyje. Į fermentinį preparatą pridėta (NH₄)SO₄ iki 1,0 M ir jis sorbuotas ant hidrofobinio Phenyl Sepharose 6 Fast Flow sorbento.

Eliuoti nesorbuoti baltymai (esant 1,0 M amonio sulfato koncentracijai iš kolonos išsiplauna J6-1-I izofermentas ir nedidelė dalis J6-1-II izofermento), o sorbuoti baltymai frakcionuojami 1,0 – 0 M amonio sulfato gradientu.

Iš kolonos eliuotas sorbuotas J61-2 izofermentas. Frakcijos turinčios aktyvumą surinktos ir dializuotos 2,0 mM kalio fosfatiniame buferyje. Eliuotas su nesorbuotais baltymais J61-1 izofermentas papildytas amonio sulfatu iki 2,0 M ir, sulygsvarinus tą pačią kolonėlę su 2,0 M amonio sulfatu 2,0 mM kalio fosfatiniame buferyje, sorbuotas joje pakartotinai. Išsiplovus

nesorbuotiems baltymams, J6-I izofermentas eliuotas 2,0 – 0 M amonio sulfato gradientu. Frakcijos turinčios aktyvumą surenkamos ir dializuojamos 2,0 mM K-P buferyje.

Toliau lakazių izofermentai gryninti tuo pačiu būdu, bet kiekvienas atskirai. Kolonėlė Resource Q sulysvarinta 2,0 mM K-P buferiu, pH 7,0. Fermentai sorbuoti kolonėlėje ir, eliuavus nesorbuotus baltymus, atplaunami 2,0 mM - 300 mM kalio fosfatinio buferio pH 7,0 gradientu. Frakcijos su aktyvumu surinktos, sukonzentruotos ir toliau tiriamos arba saugomos -20°C temperatūroje, fermentinį preparatą papildžius 10 mg/ml sacharozės.

Išgrynintų izofermentų molekulinė masė ir grynumas buvo nustatomas atliekant SDS-PAGE elektroforezę.

2.3 pH ir temperatūrinis optimumas

Lakazės aktyvumas kultūrinėje terpėje buvo matuojamas pagal sintetinio substrato ABTS oksidaciją 414 nm bangoje 30 °C temperatūroje. Naudojantis spektrofotometru, matuojant oksidacijos produkto susidarymo greitį, nustatytas abiejų lakazės izoformų optimalus pH ir temperatūra. Aktyvumas matuotas po 24 valandų inkubavimo 4°C bei 25°C temperatūroje skirtingo pH buferiniuose tirpaluose. Taip pat įvertinta temperatūros įtaka, matuojant esant 35-60 °C temperatūrai.

2.4 Izofermentų stabilumas

Tokiu pačiu principu nustatytas ir fermentų stabilumas 27 dienų laikotarpyje, laikant skirtingose sąlygose: kambario temperatūroje, šaldytuve (4°C), šaldiklyje (-20°C) ir laikant -20 °C temperatūroje ir atšildant prieš matuojant, po to vėl užšaldant. Aktyvumas nustatomas spektrofotometriškai matuojant sugerties kitimą laike, kaip substratą naudojant ABTS, pradinis aktyvumas prilygintas 100%. Gautos izofermentų aktyvumo kitimo laike priklausomybės kai fermentai laikomi skirtingose sąlygose.

2.5 Medžiagos ir reagentai:

(ABTS) 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninė rūgštis), promazino hidrochloridas (PZ), siringaldazinas (SYR), natrio acetatas, natrio hidroksidas pirkti Sigma-Aldrich, Šveicarija. Metilsiringatas (MS), Lankasterio sintezės produktas, rekristalizuotas iš etanolio. *N,N'*-dimetilamino-4-(4-morfolino)benzenas (AMB) susintetintas pagal (Kulys et al., 2006a). 3(10H-fenoksazino-10-yl)etanolis (PPA), susintetinta pagal (Kulys et al., 2006b). 2,6-dimetoksifenolis (DMP) gautas iš "Alfa Aesar", Vokietija. Metanolis, kavos rūgštis (CAA) gauti iš Fluka, Šveicarija. Katecholis (CAT), hidrochinonas (HQ), p-fenilendiaminas (PDA) ir kalio heksacianoferatas(II) (FERO) gauti iš Reachim, Rusija.

Tiriamų substratų ir druskų tirpalai gauti juos ištirpinus distiliuotame vandenyje (ABTS, FERRO, HQ, CAT, PDA, PZ) arba etanolyje (AMB, MS, PPA, SYR, CAA, DMP)

Metallų druskos: aliuminio fluoridas (AlF_3), vario bromidas (CuBr_2), kalio bromidas (KBr), aliuminio chloridas (AlCl_3), kobalto chloridas (CoCl_2), vario chloridas (CuCl_2), kalio chloridas (KCl), magnio chloridas (MgCl_2), mangano chloridas (MnCl_2), nikelio chloridas (NiCl_2), kadmio jodidas (CdJ), kalio jodidas (KI), sidabro nitratas (AgNO_3), kalio nitratas (KNO_3), kobalto sulfatas (CoSO_4), vario sulfatas (CuSO_4), vario acetatas ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), natrio acetatas (CH_3COONa), natrio chloridas (NaCl) gauti iš Reachim, Rusija. Natrio fluoridas (NaF) iš Merck, Rusija. Ličio sulfatas (Li_2SO_4), magnio sulfatas (MgSO_4), mangano sulfatas (MnSO_4), natrio sulfatas (Na_2SO_4), cinko sulfatas (ZnSO_4), gyvsidabrio acetatas ($\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), cinko acetatas ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), natrio azidas (NaN_3) gauti iš Sigma-Aldrich, Šveicarija.

2.6 Kinetiniai matavimai:

2.7.7 Substratinio specifškumo tyrimai

Kinetiniai tyrimai atlikti spektrofotometrinio metodu, naudojant kompiuterizuotą spektrofotometrą "Evolution 300". Šie matavimai atlikti 50,0 mM natrio acetatiniame buferiniame tirpale pH 5,5, termostatuojant 25 °C temperatūroje, esant pastoviam bangos ilgiui. Tirtos substratų oksidacijos, esant pastoviam bangos ilgiui. Oksiduoto substrato koncentracija apskaičiuota naudojant atitinkamus molinius ekstinkcijos koeficientus: CAA $\epsilon_{310} = 9,5 \pm 0,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, MS $\epsilon_{280} = 9,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, SYR $\epsilon_{530} = 65 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ABTS $\epsilon_{414} = 36 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Marcinkevičienė et al.), PZ $\epsilon_{514} = 8.9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ir PPA $\epsilon_{530} = 16 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Kulys et al., 2000), FERRO $\epsilon_{420} = 1.02 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Schellenberg and Hellerman, 1958), AMB $\epsilon_{604} = 13.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Kulys et al., 2006a), CAT $\epsilon_{410} = 0.74 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Shleev et al., 2007), HQ $\epsilon_{248} = 17,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (C. Minussi et al., 2007), PDA $\epsilon_{455} = 17.0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (pH 5.5) (Karaseva et al., 2003), DMP $\epsilon_{468} = 49.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (González, 2006).

2.7.2 pH įtaka reakcijos greičiui

Tiriant fermentinės reakcijos greičio priklausomybę nuo pH su įvairiais substratais, naudotas 0,06 M trikomponentis Britton-Robinson buferinis tirpalas (BRB), pastovi tiriamo substrato ir fermento koncentracija. Vertinant buferinio tirpalo pH įtaką substratų oksidacijos greičiui, reakcijų greičiai perskaičiuoti į santykinus reakcijų greičius didžiausią reakcijos greitį prilyginant 100 %.

2.7.3 Įvairių druskų poveikis izofermentų aktyvumui

Įvairių metallų druskų poveikio lakazių aktyvumui tyrimai atlikti substratu naudojant ABTS ir keičiant druskų koncentracijas. Kinetiniai matavimai atlikti 50 mM acetatiniame buferiniame

tirpale, pH 5.5, termostatuojant 25 °C temperatūroje. Vertinant metalų druskų įtaką pradiniam reakcijos greičiui, reakcijos greičiai perskaičiuoti į santykinius reakcijų greičius, pradinį reakcijos greitį be druskų prilyginant 100%.

2.7.4 Duomenų analizė ir konstantų skaičiavimai

Reakcijų greičiai gauti glodinant kreives, esant tiesinei priklausomybei išskaičiuojami iš nuolinko kampo. Sugerties kitimo kinetinės kreivės buvo perskaičiuojamos į substrato ar produkto koncentracijos kitimo kreives naudojant molinės sugerties koeficientą. Gavus pradinių reakcijos greičių priklausomybę nuo substratų koncentracijų ir panaudojus Michaelis – Menten lygtį, nustatytos $V_{\max}$ ir K_M reikšmės. Katalitinė konstanta (k_{kat}) apskaičiuota, kaip reakcijos $V_{\max}$ ir fermento koncentracijos santykis ($V_{\max}/[E]$). Fermento ir substrato reakingumo konstanta (k_{bim}) gauta iš katalitinės konstantos ir K_M santykio (k_{kat}/K_M). Skaičiavimai buvo atlikti Mathcad 2001 Professional programa, grafikai nubraižyti naudojantis kompiuterine programa SigmaPlot 12.5 ir GraFit 3.01.

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo naudotas *Didymocrea sp.* J61 grybinis kamienas, kuris produkavo lakazes. Jau anksčiau buvo žinoma, kad šis grybo kamienas produkuoja kelis lakazių izofermentus, vienas iš jų (J61-2) buvo išskirtas, nustatytas jo optimalus pH, molekulinė masė ir aktyvumas, tirtas bioelektrokatalizinis lakazės veikimas, adsorbavus šį fermentą deguonį redukuojančiu T2/T3 aktyviuoju vario centru ant aukso nanodalelių paviršiaus (Dagys et al., 2016).

Antrasis izofermentas (J61-1) buvo produkuojamas žymiai silpniau ir jis nebuvo grynintas ir tirtas. Šio tyrimo metu buvo išgryninti abu izofermentai, tiriamos abi izoformos, lyginamos jų fiziko – cheminės bei kinetinės savybės.

3.1 *Didymocrea sp.* J61 izofermentų gryninimas

Lakazes produkuojantys grybai *Didymocrea sp.* išskirti iš dirvožemio mėginių ir paauginti ant agarizuotos palaikymo terpės (**9 pav**). Paruoštas inokuliatas, kuris vėliau persėtas į didesnes kolbas ir augintas 30°C temperatūroje.



9 pav. Užaugintas *Didymocrea sp.* grybas

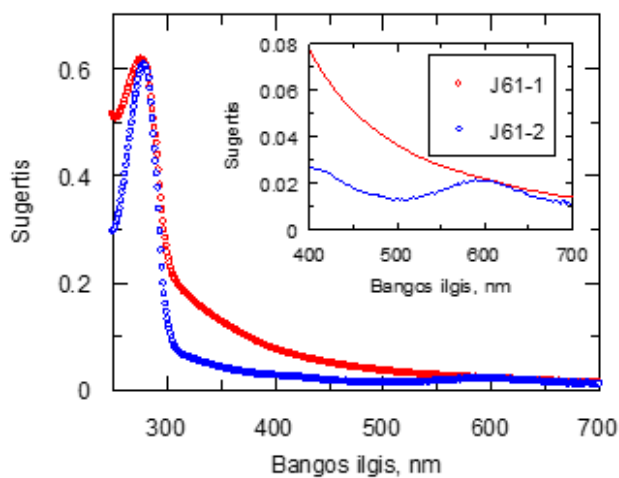
Fermentų gryninimas aprašytas metodinėje dalyje, rezultatai apibendrinti 1-oje lentelėje.

1 lentelė Izofermentų gryninimo duomenys

Gryninimo žingsnis	Bendras aktyvumas (vnt/ml)	Baltymo kiekis (mg)	Specifinis aktyvumas (U/mg)	Išvalymo laipsnis	Išeiga (%)
Kultūriniame skystyje	11100	6225,0	1,60	1,0	100,0
Jonų mainų chromatografija (SuperQ Toyopearl)	10174,0	1330,0	7,7	4,7	92,0
Hidrofobinė chromatografija (PHE FF)	J61-1 - 1020,0 J61-2 - 9054,0	J61-1 – 680,0 J61-2 – 70,0	J61-1 – 1,5 J61-2 – 129,0	J61-1 N.D J61-2 79,6	J61-1 – N.D J61-2 – 67,5
Jonų mainų chromatografija (Source Q15)	J61-1 – 3,9 J61-2 - 6575,0	J61-1 – 1,1 J61-2 – 14,9	J61-1 – 3,6 J61-2 – 441, 0	J61-1 – N.D. J61-2 – 272,0	J61-1 – N.D. J61-2 – 59, 0

Išgrynintų izofermentų molekulinės masės buvo nustatytos taikant SDS-PAGE elektroforezės metodą. J61-1 ir J61-2 molekulinės masės yra 90,0 ir 59,0 kDa.

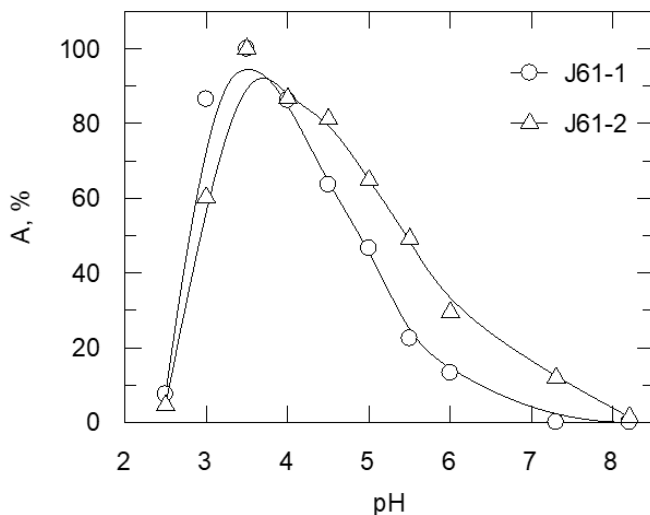
J61-2 izoforma turėjo tipinę vario atomų turintiems fermentams mėlyną spalvą, o J61-1 melsvo atspalvio nesimatė, todėl buvo užrašytas abiejų izofermentų sugerties spektras (**10 pav.**).

**10 pav.** J61-1 ir J61-2 sugerties spektras

J61-2 nustatytas vienas pikas ties 600 nm ilgio banga, kas lemia pirmojo tipo vario (Cu^{2+}) buvimą, kuris yra atsakingas už mėlyną spalvą. Todėl galima daryti prielaidą, kad tai mėlynoji lakazė, o J61-1 - geltonoji arba baltoji lakazė.

3.2 Izofermentų stabilumas, temperatūrinis ir pH optimumai

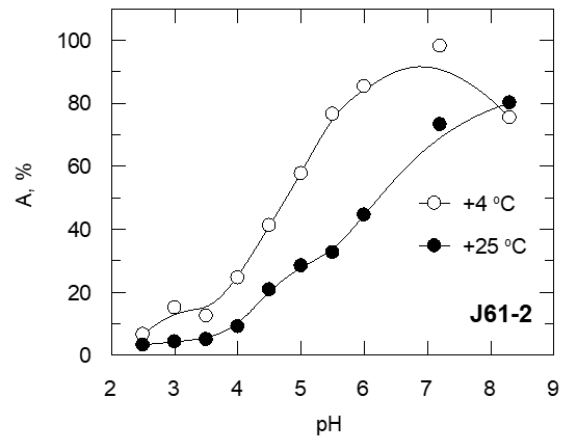
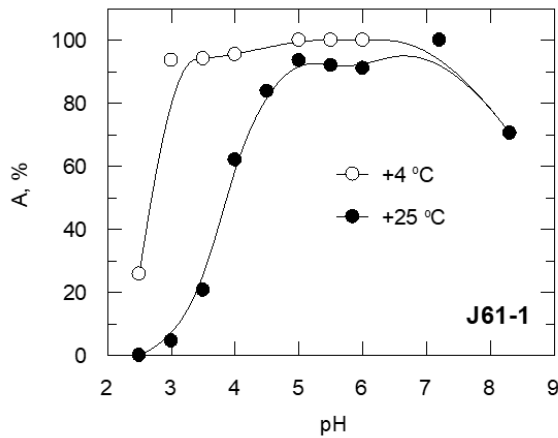
Naudojant spektrofotometrinį metodą, matuojant fermento aktyvumą skirtingo pH buferiniuose tirpaluose, kaip substratą naudojant ABTS, buvo nustatyti pH optimumai abiem izofermentams. Didžiausia aktyvumo reikšmė prilyginta 100%. Gautos procentinės izofermentų aktyvumo priklausomybės nuo buferinio tirpalo pH. Abiem izofermentam optimalus pH stebimas rūgštinėje srityje ir lygus 3,5 (**11.1 pav**). J61-1 aktyvumas didinant buferinio tirpalo pH mažėja greičiau nei J61-2. Aktyvumas beveik visiškai prarandamas, kai pH lygus 8,0. Izofermentų aktyvumas greitai krenta ir kai buferinio tirpalo pH rūgštėja nuo 3,5 iki 2,7, lieka tik 1-3 % jo pradinio aktyvumo



11.1 pav. J61-1 ir J61-2 izofermentų aktyvumo priklausomybės nuo buferinio tirpalo pH.

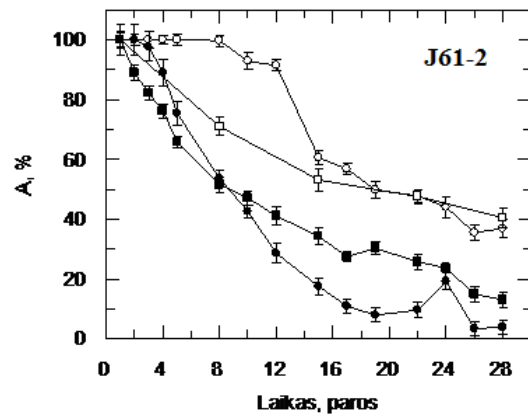
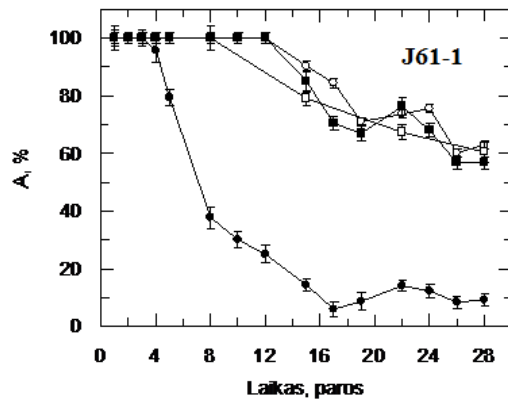
Aktyvumas matuotas skirtingo pH (0,1 M Na citratiniame (pH 3,0-5,5) arba kalio fosfatiname (pH 6,0-7,0) buferiniuose tirpaluose, 30 °C temperatūroje.

Buvo nustatytas J61-1 ir J61-2 izofermentų stabilumas laikant juos 24 val. skirtingo pH buferiniuose tirpaluose, esant 4°C ir 25°C temperatūrai.



11.2 pav. J61-1 ir J61-2 izofermentų stabilumo priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH. Fermentiniai tirpalai inkubuoti atitinkamo pH tirpale 24 val., esant 4°C ir 25°C temperatūrai.

J61-1 lakazės aktyvumas labai sumažėja (lieka 25 % pradinio aktyvumo) laikant buferiniuose tirpaluose, kurių pH mažesnis nei 3,0. Šarmėjant buferinio tirpalo pH nuo 3,0 iki 7,0 J61-1 lakazės aktyvumas staigiai padidėja ir išlieka gana stabilus (90 -100 %) ir pradeda mažėti pH padidėjus iki 8,0, kai tirpalas laikomas +4 °C temperatūroje. Jei J61-1 lakazė laikoma +25 °C temperatūroje, tai lakazės stabilumas didėja palaipsniui ir pasiekia 90 – 100 % aktyvumo pH intervale 5,0-7,0. Buferiniam tirpalui šarmėjant J61-2 lakazės stabilumas didėja tiek laikant 4 °C tiek 25°C temperatūroje. J61-2 lakazė stabilesnė laikant fermento tirpalus 4°C temperatūroje, esant šarminiam buferinio tirpalo pH intervale 5,5-7,0.



12 pav. Izofermentų stabilumas, esant skirtingoms laikymo sąlygoms: 4 °C (○); kambario temperatūroje (●); -20 °C, atšildant tik prieš matavimą (□); -20 °C, atšildant tik prieš matavimą, po to vėl užšaldant (■).

Tirtas ir izofermentų stabilumas, laikant jų tirpalus skirtingomis sąlygomis (šaldytuve (4°C), kambario temperatūroje (20 °C), šaldiklyje (-20 °C), ir kiekvieną kartą atitirpinant iš -20°C. Aktyvumas pamatuotas pirmą dieną spektrofotometriškai prilygintas 100 %. Gautos procentinės aktyvumo priklausomybės, nuo laikymo sąlygų (**12 pav.**). Gauti rezultatai rodo, kad abi izoformos stabilesnės laikant fermentinį tirpalą 4 °C temperatūroje. Pirmas 12 dienų J61-1 izofermentas išlieka stabilus (aktyvumas 100 %), o J61-2 izofermento aktyvumas pradeda mažėti jau po 10 parų. 28-ą parą J61-1 izofermento aktyvumas sumažėja iki 60 %, o J61-2 – iki 40 %. Laikant fermentų tirpalus kambario temperatūroje aktyvumai palaipsniui mažėja, o po dviejų savaitių abu izofermentai praktiškai inaktyvuojasi (lieka apie 5 %).

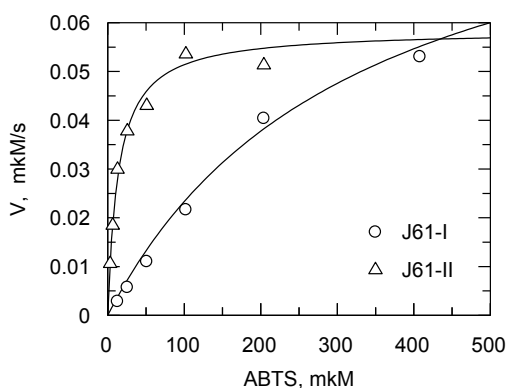
Ryškūs aktyvumo kitimo skirtumai stebimi laikant fermentinius tirpalus -20 °C temperatūroje ir kiekvieną kartą atitirpinant iš -20°C. J61-1 lakazės aktyvumas praktiškai nekito 10 parų, o J61-2 aktyvumas drastiškai krito jau nuo pirmos dienos. 28-ą parą J61-1 izofermento aktyvumas sumažėja iki 60 %, o J61-2 – iki 40 % laikant -20 °C temperatūroje ar net iki 10 % kiekvieną kartą jį atitirpinant.

3.3 Substratinis savitumas

Substratų oksidacija katalizuojama J61-1 ir J61-2 izofermentų buvo tirta spektrofotometrinio metodu, esant fiksuotam bangos ilgiui ir naudojant įvairius substratus.

Visų pirma tirtos pradinio reakcijos greičio priklausomybės nuo izofermento koncentracijos, siekiant pasirinkti tinkamiausią fermento koncentraciją kiekvienam substratui. Po to iš kinetinių kreivių gautų, esant skirtingoms substrato koncentracijoms, gautos reakcijos greičio

priklausomybės nuo substrato koncentracijų. **13 paveikslėlyje**, kaip pavyzdys, pateiktos J61-1 ir J61-2 lakazių katalizuojamos oksidacijos reakcijos greičio priklausomybės nuo ABTS koncentracijos.



13 pav. J61-1 ir J61-2 katalizuojamos reakcijos greičio priklausomybės nuo ABTS koncentracijos. J61-1 37 nM, J61-2 2,7 nM.

Gautos hiperbolinės reakcijos greičio priklausomybės nuo ABTS koncentracijos glodintos taikant Michaelio – Menten lygtį. Iš gautų kreivių nustatytos kinetinių parametų $V_{\max}$ ir K_M reikšmės bei apskaičiuotos katalizinės (k_{kat}) ir biomolekulinės substrato bei fermento reakingumo (k_{bim}) konstantos (**2 lentelė**).

Iš **2-oje** lentelėje pateiktų gautų eksperimentinių parametų matyti, kad mažesnė K_M reikšmė oksiduojant ABTS gaunama su J61-2 lakaze, kas rodo geresnį junginio giminingumą šiai lakazei. Su J61-1 ši reikšmė didesnė, ši izoforma pasižymi blogesniu giminingumu šiam substratui. Apskaičiuotos bimolekulinės fermento ir substrato reakingumo reikšmės, rodo, kad J61-2 k_{bim} reikšmė gerokai didesnė už J61-1, tai rodo, kad šis fermentas ne tik giminingesnis bet ir reakingesnis.

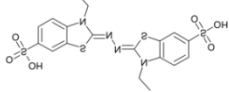
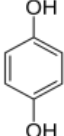
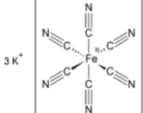
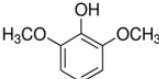
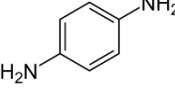
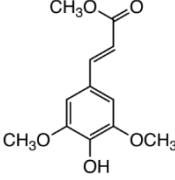
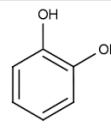
Analogiškai atlikti tyrimai ir su kitais substratais. Gauti rezultatai pateikti 2-oje lentelėje.

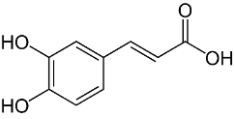
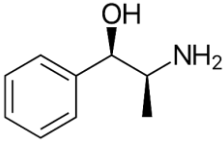
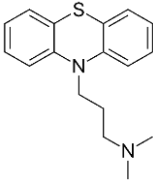
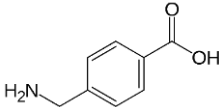
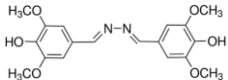
Iš lentelėje pateiktų duomenų galime pastebėti, kad J61-2 izofermentas yra labiau giminingas ABTS, AMB, syringaldazinui ir ferocianidui nei J61-1, K_M reikšmės gautos katalizei naudojant J61-2 žymiai mažesnės nei naudojant J61-1. Katalizinis efektyvumas J61-2 lakazės, oksiduojant ABTS, AMB ir ferocianidą taip pat yra didesnis nei J61-1. ABTS J61-2 oksiduoja beveik 25, AMB - 4,3, o ferocianidas -1000 kartus efektyviau nei J61-1. Siringaldaziną abi lakazės oksiduoja panašiu efektyvumu.

Tuo tarpu HQ, DMP, CAT ir kavos rūgštį efektyviau oksiduoja J61-1 lakazė, nei J61-2. HQ J61-1 oksiduoja beveik 30, DMP - 55, CAT – 5, o kavos rūgštis – 34 kartus efektyviau nei J61-2. Giminingumas šiems substratams taip pat didesnis J61-1 lakazei.

Abiejų izofermentų giminingumas likusiems substratams - PPA, PZ, MS ir PDA labai panašus skirtumas siekia 2 kartus. Pvz. PPA K_M reikšmės J61-1 ir J61-2 atitinkamai lygios $58 \pm 17 \mu\text{M}$ ir $52 \pm 15 \mu\text{M}$. Katalizinis efektyvumas taip pat panašus, skiriasi tik 2-3 kartus. Pvz. su PPA (k_{bim}) reikšmės J61-1 ir J6-2 atitinkamai lygios $(7,5 \pm 1,4) \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ir $(3,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Gauti rezultatai rodo, kad efektyviausiai J61-1 oksiduoja PPA ir syringaldaziną, blogiausiai – ferocianidą, tuo tarpu J61-2 geriausiai oksiduoja ABTS ir FERRO, o blogiausiai - HQ ir DMP.

Substratas	Lakazė	[E], nM	K _M , μM	V _{max} , μM·s ⁻¹	k _{kat} , s ⁻¹	k _{bim} , μM ⁻¹ ·s ⁻¹
ABTS 	J61-1	37	355±83	(1,0±0,1)·10 ⁻¹	2,8±0,3	(8,0±1,0)·10 ⁻³
	J61-2	2,7	14±2	(5,9±0,3)·10 ⁻²	22,0±1,0	1,6±0,15
HQ 	J61-1	7,4	1780±850	(1,7±0,5)·10 ⁻²	2.1±0,3	(1,3±0,2)·10 ⁻³
	J61-2	36,5	3470±1290	(0,5±0,1)·10 ⁻²	0,15±0,04	(4,3±1,0)·10 ⁻⁵
FERO 	J61-1	14,8	31200±440	(6,1±0,4)·10 ⁻²	2,8±0,3	(1,3±0,1)·10 ⁻⁴
	J61-2	0,9	90±13	(1,2±0,1)·10 ⁻¹	128 ±7,0	1,4±0,1
DMP 	J61-1	19,5	3730±200	(7,4±0,6)·10 ⁻³	1,0±0,08	(2,7±0,5)·10 ⁻⁴
	J61-2	19,5	7290±535	(1,1±0,1)·10 ⁻²	0,36±0,02	(4,9±1,0)·10 ⁻⁶
PDA 	J61-1	7,42	2000±400	(1,1±0,1)·10 ⁻²	1,5±0,1	(7,6±1,3)·10 ⁻⁴
	J61-2	7,3	7450±420	(2,0±0,6)·10 ⁻²	2,7±0,8	(3,7±0,4)·10 ⁻⁴
MS 	J61-1	22,3	160±31	(1,5±0,2)·10 ⁻³	(6,7±0,9)·10 ⁻²	(3,9±1,3)·10 ⁻⁴
	J61-2	19,5	193±90	(1,0±0,4)·10 ⁻³	(5,1±2,1)·10 ⁻²	(2,7±0,1)·10 ⁻⁴
CAT 	J61-1	14,5	7760±700	0,24±0,01	16,6±0,6	(2,1±0,1)·10 ⁻³
	J61-2	21,9	93400±13700	0,8±0,01	37,4±0,1	(4,0±0,1)·10 ⁻⁴
Kavos r.	J61-1	11,0	-	-	-	(1,7±0,3)·10 ⁻³

Substratas	Lakazė	[E], nM	K _M , μM	V _{max} , μM·s ⁻¹	k _{kat} , s ⁻¹	k _{bim} , μM ⁻¹ ·s ⁻¹
	J61-2	14,6	-	-	-	(5,0±0,3)·10 ⁻⁵
PPA 	J61-1	7,4	58±17	(3,2±0,5)·10 ⁻²	4,3±0,7	(7,5±1,4)·10 ⁻²
	J61-2	14,6	52±15	(2,3±0,4)·10 ⁻²	1,6±0,3	(3,1±0,7)·10 ⁻²
PZ 	J61-1	18,5	4420±940	(4,6±0,1)·10 ⁻²	2,5±0,1	(5,6±0,3)·10 ⁻⁴
	J61-2	2,9	7600±1840	(2,0±0,4)·10 ⁻²	7,0±1,2	(9,2±2,0)·10 ⁻⁴
AMB 	J61-1	18,5	5600±1620	(8,2±1,4)·10 ⁻²	4,3±0,7	(7,9±1,0)·10 ⁻⁴
	J61-2	2,9	11090±3800	(1,3±0,3)·10 ⁻¹	42,9±20,0	(3,4±0,7)·10 ⁻³
SYR 	J61-1	30,0	111±15	(4,0±0,4)·10 ⁻²	1,3±0,2	(1,2±0,1)·10 ⁻²
	J61-2	14,6	49±15	(1,3±0,2)·10 ⁻²	0,9±0,2	(1,8±0,1)·10 ⁻²

2 lentelė tirtų substratų oksidacijos, katalizuojamos *Didymocrea sp* lakazės izofermentų J61-1 ir J61-2, kinetinių parametų reikšmės. Eksperimento sąlygos: 50 mM natrio acetatinis buferinis tirpalas pH 5,5; 25 °C.

Iš gautų parametų matoma, kad priklausomai nuo substrato, abiejų izofermentų reaktingumas skirtingas. Gauti kinetiniai parametrai rodo, kad lakazės nėra labai specifiškos kokiai nors substratų grupei.

3.4 Aktyvumo priklausomybė nuo pH

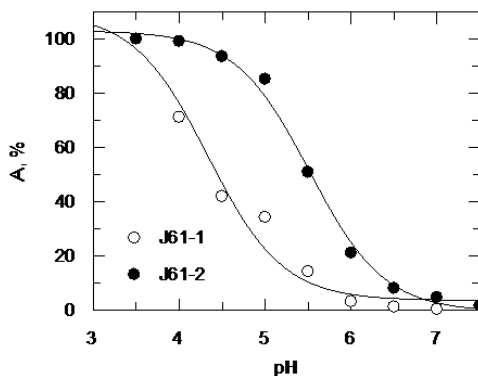
Spektrofotometrinio metodu buvo tirtos pradinio reakcijų greičio priklausomybės nuo buferinio tirpalo pH (3,0–9,0 intervale), oksiduojant tradicinius lakazių substratus J61-1 ir J61-2 izofermentais.

Iš gautų rezultatų matoma, kad pH stipriai veikia reakcijos greitį, o pH optimumas skiriasi, priklausomai nuo substrato. pH veikia fermento bazinių ar rūgštinių amino rūgščių jonizaciją, taip pat veikia substrato struktūrą ir krūvį, todėl sumažėja fermentinis aktyvumas (Patel et al., 2014). Matuojant reakcijos greičio priklausomybę su ABTS, gautos sigmoidinės kreivės, J61-1 izoforma jautresnė pH įtakai, pH didėjant aktyvumas krenta staigiai, tuo tarpu J61-2 šiek tiek atsparesnė, 90-100 % aktyvumą išlaiko pH intervale nuo 3,5 iki 4,5 (**14 pav. a.**). Panaši sigmoidinė priklausomybė stebima kaip substratą naudojant kalio ferocianidą (**14 pav. b.**). Didžiausias aktyvumas reakciją katalizuojant J61-1 lakaze stebimas labiau rūgštinėje (pH 3,0), o su J61-2 labiau šarminėje (pH 4,0-4,5).

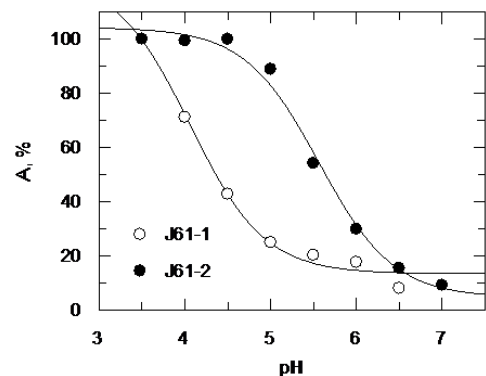
Tuo tarpu su syringaldazinu, kavos rūgštimi ir AMB gautos varpo formos priklausomybės (**14 pav. c., d., e.**). Su syringaldazinu fermentų veikimo optimumas pakankamai siauras, ir stebimas šarminėje pH srityje. J61-2 izoformos optimumas aiškiai pasislinkęs labiau į šarminę pusę lyginant su J61-1 kurios optimalus pH 6,5, o J61-2 apie 8,5. pH pakitus per 0,5, aktyvumas krenta perpus. Su kavos rūgštimi matoma panaši tendencija, bet šiuo atveju J61-2 lakazės aktyvumas stebimas žymiai platesniame pH intervale nei J61-1. AMB substratą abi lakazės oksiduoja panašiai, didžiausias aktyvumas stebimas ties pH 5,5-6,0.

Tuo tarpu oksiduojant DMP (**14 pav. f.**) rezultatai išsiskyrė. Su J61-1 gauta varpo formos priklausomybė, su gana plačiu pH optimumu (pH 4,0-6,0), o J61-2 priklausomybė sigmoidinė, optimumas pasislinkęs į šarminę pusę, tarp 7,5-8,5.

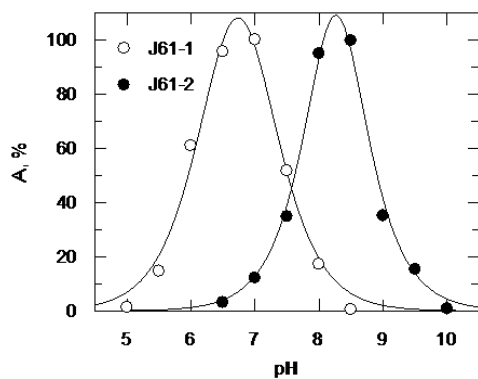
a.



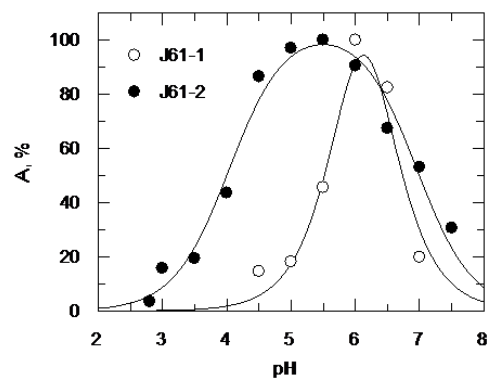
b.



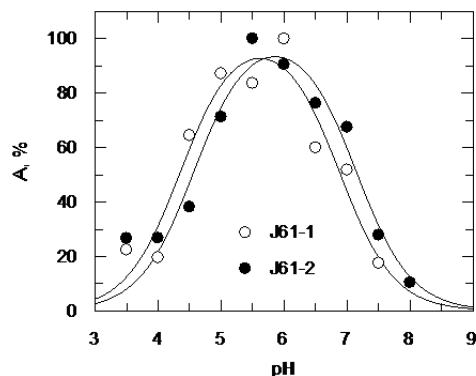
c.



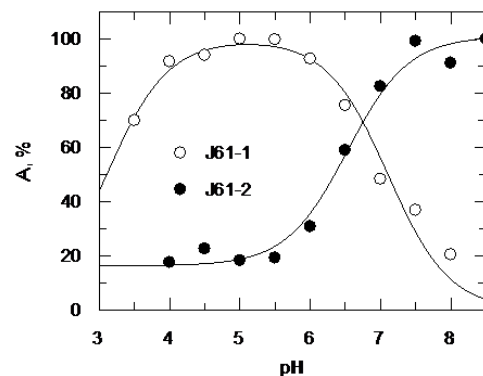
d.



e.



f.



14 pav. Izofermentų aktyvumo priklausomybės nuo pH, oksiduojant: ABTS (a), FERRO (b), SYR (c), CAA (d), AMB (e), DMP (f).

Substratų koncentracijos: ABTS - 100 μ M; FERRO - 75 μ M (J61-1), 350 μ M (J61-2); SYR - 15 μ M; CAA. - 100 μ M; AMB - 700 μ M; DMP – 15 mM(J61-1), 5mM (J61-2);

Iš pateiktų rezultatų matyti, kad greičio priklausomybės nuo pH, gautos oksidacijos reakcijas katalizuojant J61-1 izofermentu, yra labiau pasislinkusios į rūgštinę pusę nei katalizuojant J61-2 izofermentu. J61-2 lakazė linkusi oksiduoti tirtus junginius labiau šarminėje terpėje.

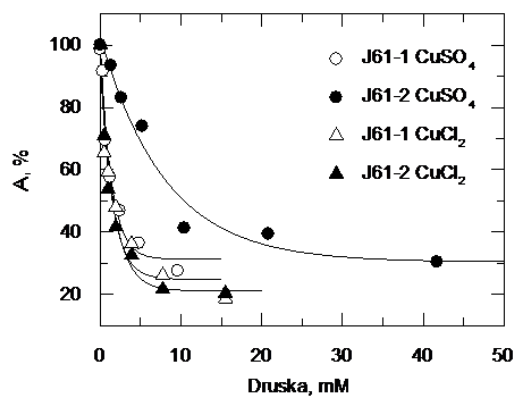
3.5 Metalų druskų įtaka

Tirtas įvairių druskų poveikis J61-1 ir J61-2 lakazės izofermentų aktyvumui.

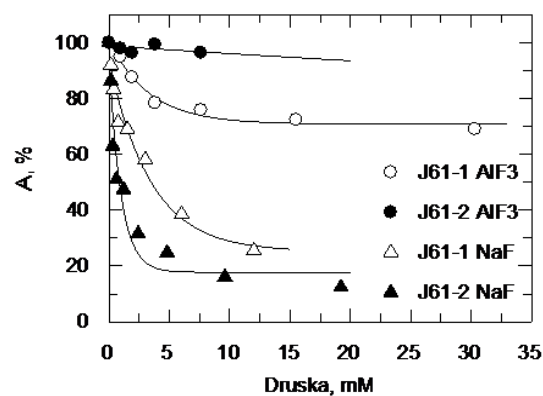
Pastebėta, kad vario druskos (**15 pav a.**) mažina fermentų aktyvumą, J61-1 slopinama stipriau nei J61-2, vario sulfatas veikia kiek stipriau nei vario chloridas. Fluoridai (**15 pav b.**) taip pat slopina izofermentus, aluminio fluoridas kiek stipriau slopina J61-1, natrio fluoridas atvirkščiai, stipriau veikia J61-2 aktyvumą. Sulfatai (**15 pav c, d.**) veikia skirtingai. J61-1 aktyvumą padidina ir natrio ir ličio sulfatas, o J61-2 ličio sulfatas aktyvumą tik nežymiai padidina, o natrio sulfatas slopina (**15 pav c.**). Cinko ir vario sulfatai (**15 pav. d.**) slopina abi lakazes, vario sulfatas stipriau veikia J61-2 nei J61-1. Didelės kalio ir natrio chloridų koncentracijos mažina izofermentinį aktyvumą, o J61-2 veikia kur kas stipriau nei J61-1 (**15 pav. e**). Lyginant sulfatų poveikį kiekvienam izofementui atskirai, matyti, kad druskos veikė J61-1 aktyvumą tokia mažėjimo seka

$\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{MnSO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{CoSO}_4 > \text{ZnSO}_4 > \text{CuSO}_4$ (15 pav. f.), o J61-2 - $\text{MnSO}_4 > \text{CoSO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{CuSO}_4 > \text{ZnSO}_4$ (15 pav. g.).

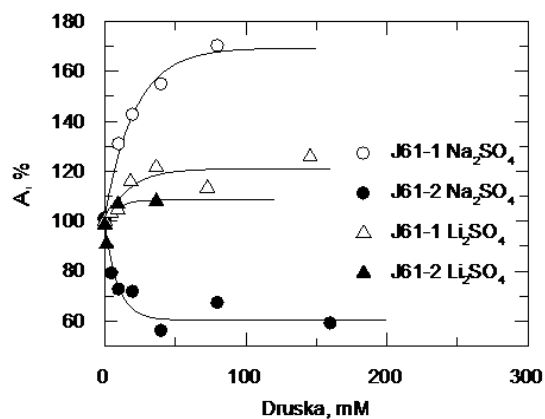
a.



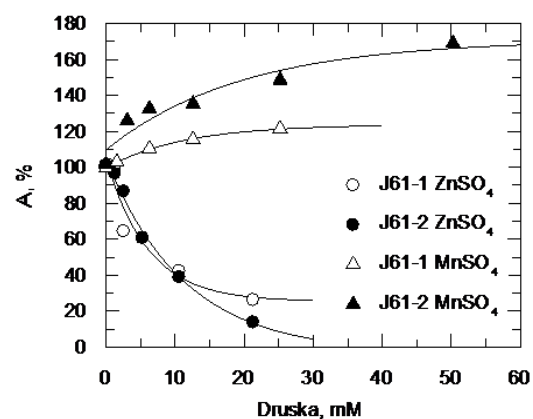
b.



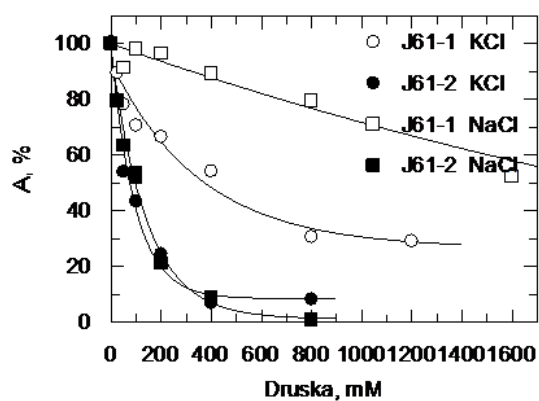
c.

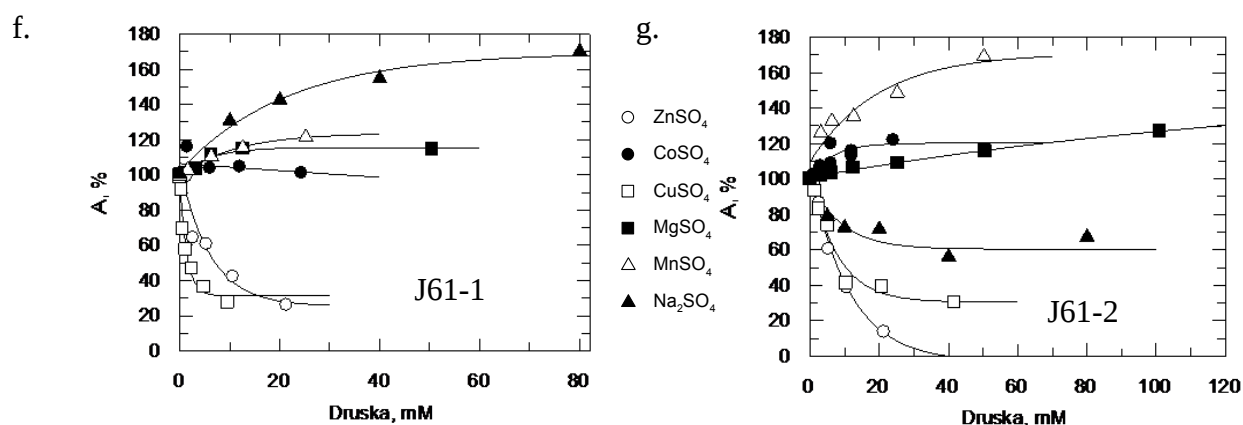


d.



e.





15 pav. Fermentinio J61-1 ir J61-2 aktyvumo priklausomybė nuo metalų druskų, kaip substratą naudojant ABTS.

Metalų druskos gali ir didinti ir mažinti fermentų aktyvumą. Iš šių duomenų matoma tendencija, kad druskų poveikis lakazių aktyvumui labiau priklauso nuo metalo, nei nuo anijono.

Panašiai buvo tirta ir kitų druskų įtaka J61-1 ir J61-2 aktyvumui. Gauti rezultatai pateikti **3-oje lentelėje**.

Lentelė 3 Fermentų aktyvumas veikiant metalų druskoms.

Metalų druskos	J61-1		J61-2	
	Didžiausia druskų koncentracija, mM	Liekamasis fermentinis aktyvumas, %	Didžiausia druskų koncentracija, mM	Liekamasis fermentinis aktyvumas, %
NaF	12,0	25,0	8,0	18,0
AlF ₃	15,0	70,0	7,0	95,0
KBr	620,0	60,0	300,0	25,0
CuBr ₂	10,0	10,0	20,0	10,0
KI	40,0	20,0	40,0	3,0
CdI	50,0	40,0	50,0	40,0
NaN ₃	0,1	12,0	0,1	5,0
KNO ₃	80,0	95,0	80,0	25,0
AgNO ₃	10,0	20,0	5,0	10,0
KCl	1200,0	30,0	800,0	10,0
NaCl	1600,0	55,0	800,0	2,0
MnCl ₂	100,0	110,0	100,0	60,0
MgCl ₂	50,0	85,0	90,0	40,0
CaCl ₂	20,0	15,0	20,0	40,0
CoCl ₂	60,0	40,0	105,0	200,0
CuCl ₂	8,0	22,0	16,0	20,0
NiCl ₂	60,0	75,0	120,0	40,0
AlCl ₃	10,0	160,0	35,0	55,0
Na ₂ SO ₄	100,0	170,0	100,0	60,0
LiSO ₄	150,0	120,0	50,0	110,0

Metalų druskos	J61-1		J61-2	
	Didžiausia druskų koncentracija, mM	Liekamasis fermentinis aktyvumas, %	Didžiausia druskų koncentracija, mM	Liekamasis fermentinis aktyvumas, %
MnSO ₄	25,0	120,0	50,0	170,0
MgSO ₄	50,0	110,0	100,0	130,0
ZnSO ₄	21,0	30,0	21,0	15,0
CuSO ₄	10,0	25,0	20,0	35,0
CoSO ₄	25,0	100,0	25,0	120,0
NaCH ₃ COOH	500,0	15,0	1000,0	25,0
Hg(CH ₃ COOH) ₂	0,25	20,0	0,25	20,0
Cu(CH ₃ COOH) ₂	9,0	20,0	20,0	80,0
Zn(CH ₃ COOH) ₂	100,0	5,0	360,0	0,0

Stipriausiai abi izoformas slopino tradiciniai lakazių slopikliai, tokie kaip natrio azidas bei fluoridas, sidabro nitratas, gyvsidabrio acetatas. J61-1 fermentinį aktyvumą didino aliuminio chloridas, natrio ličio ir mangano sulfatai, o J61-2 kobalto chloridas, magnio, mangano bei kobalto sulfatai. Kitos druskos lakazių aktyvumą skirtingu laipsniu slopino.

IŠVADOS

1. Išgryninti *Didymocrea sp. J61* lakazės J61-1 ir J61-2 izofermentai, kurių molekulinės masės atitinkamai lygios 90,0 kDa ir 59,0 kDa. J61-1 izofermentas pasižymi geltonųjų lakazių spektrinėmis savybėmis, o J61-2 – mėlynųjų.
2. Abiem izofermentams optimalus pH yra rūgštinis (apie 3,5), lakazinis aktyvumas beveik prarandamas kai buferinio tirpalo pH 8,0, esant 25 °C temperatūrai.
3. Abu izofermentai stabilesni laikant jų tirpalus +4 ir -20 °C, o kambario temperatūroje po dviejų savaitių praranda aktyvumą.
4. Tiriant substratinį savitumą pastebėta, kad J61-2 izofermento giminingumas bei katalizinis efektyvumas ABTS, AMB, syringaldazinui ir ferocianidui yra didesnis nei J61-1. Tuo tarpu HQ, DMP, CAT ir kavos rūgštį efektyviau oksiduoja J61-1 lakazė. Abiejų izofermentų giminingumas bei katalizinis efektyvumas labai panašus oksiduojant PPA, PZ, MS ir PDA.
5. Oksiduojant įvairius substratus, gautos reakcijos greičio priklausomybės nuo buferinio tirpalo pH yra sigmoidinės arba varpo formos. pH stipriai veikia reakcijos greitį, o optimalus pH skiriasi priklausomai nuo substrato. Oksidacijos reakcijos katalizuojant J61-1 izofermentu optimalus pH labiau pasislinkęs į rūgštinę pusę, pH apie 3,5, tuo tarpu J61-2 optimumalus pH dažniausiai apie pH 4-5.
6. Ištirta įvairių metalų druskų įtaka. Stipriausiai abu izofermentus slopino tradiciniai lakazių slopikliai, tokie kaip natrio azidas bei fluoridas, sidabro nitratas. Pastebėta, kad kai kurios druskos didina izofermentinį aktyvumą, tačiau dauguma – slopino. J61-1 atsparesnė metalų druskų slopinimui, kai tuo tarpu J61-2 aktyvumą dauguma druskų slopino labiau.

SANTRAUKA

Dovilė PATLABAITĖ

Didymocrea sp lakazės izofermentų biosintezė, gryninimas ir savybių tyrimas

Darbo vadovai: Regina Vidžiūnaitė

Darbas atliktas Biochemijos instituto Bioanalizės skyriuje

Šiame darbe buvo išgryninti *Didymocrea* sp. J61 lakazės izofermentai (J61-1 ir J61-2). J61-1 izofermentas pasižymi baltųjų arba geltonųjų lakazių spektrinėmis savybėmis, J61-2 turi smailę ties 600 nm ilgio banga ir intensyvią mėlyną spalvą, kas būdinga mėlynosioms lakazėms. Naudojantis SDS-PAGE metodu nustatytos fermentų molekulinės masės, jos atitinkamai lygios 90,0 ir 59,0 kDa.

Ištirtos J61-1 ir J61-2 izofermentų fiziko-cheminės savybės. Abiem izofermentams optimalus pH yra rūgštinis (apie 3,5), beveik visiškai aktyvumas prarandamas kai pH 8,0. Abu izofermentai stabilesni laikant fermentų tirpalus +4 ir -20 °C, kambario temperatūroje po dviejų savaičių izofermentai praranda aktyvumą.

Taip pat ištirtos J61 izofermentų kinetinės savybės, t.y. substratinis savitumas įvairiems lakazių substratams. Nustatytos kinetinių parametrų V_{max} ir K_M reikšmės bei apskaičiuotos katalizinės (k_{kat}) ir biomolekulinės substrato ir fermento reakingumo (k_{bim}) konstantos. Efektyviausiai J61-1 oksiduoja PPA ir syringaldaziną, blogiausiai – ferocianidą, tuo tarpu J61-2 geriausiai oksiduoja ABTS ir ferocianidą, o blogiausiai - HQ ir DMP.

Tirtos reakcijos greičio priklausomybės nuo buferinių tirpalų pH. pH optimumai skiriasi priklausomai nuo substrato. Oksidacijos reakcijas katalizuojant J61-1 izofermentu pH optimumai labiau pasislinkę į rūgštinę pusę, pH apie 3,5, tuo tarpu J61-2 pH optimumai dažniausiai apie 4,0-5,0. Tirta įvairių metalų druskų įtaka lakazių aktyvumui. Nustatyta, kad kai kurios druskos didina izofermentų aktyvumą. Pastebėta, kad J61-1 izofermentas labiau atsparus įvairių druskų poveikiui lyginant su J61-2.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, metodai ir medžiagos, rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūros šaltiniai.

Raktiniai žodžiai: lakazė, *Didymocrea* sp., izofermentas, fiziko-cheminės savybės, kinetinės savybės, pH.

SUMMARY

Dovilė PATLABAITĖ

Biosynthesis, purification and characterisation of a newly produced fungal laccases from
Didymocrea sp.

Supervisor: Regina Vidžiūnaitė

Vilnius University, Life Sciences Center,
Institute of Biochemistry, Bioanalysis department

In this work, two laccase isoenzymes J61-1 and J61-2 were purified from *Didymocrea sp.* fungi. J61-1 has white or yellow laccase properties while J61-2 has a peak at 600nm wavelength – typical characteristics of blue laccase. The molecular mass of the enzymes were determined to be equal to 90,0 and 59,0 kDa respectively, using the SDS-page method.

The physico-chemical properties of J61-1 and J61-2 isoenzymes were analysed. Both isoenzymes have an acidic pH optima of 3.5. The enzymatic activity is almost completely lost at pH of 8.0. Both isoenzymes are more stable while their solutions are stored in lower temperatures of +4, -20 °C. After two weeks of being stored in room temperature the isoenzymes lose their activity

Kinetic properties of J61 enzymes such as substrate specificity for various laccase substrates were tested. Kinetic parameter values V_{max} and K_M were determined, catalytic (k_{cat}) and biomolecular substrate and enzyme efficiency (k_{bim}) constants were calculated. Most efficiently, J61-1 oxidizes PPA and syringaldazine, worst of all, ferrocyanide, while J61-2 best oxidizes ABTS and ferrocyanide, and worst, HQ and DMP.

Purified enzymes were tested for their characteristics under different pH conditions. The reaction rate dependence on the buffer solutions pH were determined. The pH optimum varies depending on the substrate. The optimal pH value of the oxidation reaction, catalyzed by the isoenzyme J61-1, is observed in a more acidic medium at about 3.5, while the optimum pH value with J61-2 is usually about 4.0-5.0. The influence of various metal salts on the activity of laccases was studied. It was discovered that some salts increase isoenzyme activity. It has been observed that the J61-1 isoenzyme is more resistant to the effects of various salts compared to J61-2.

This essay consists of 6 parts: introduction, review of literature, materials and methods, results and discussion, conclusions and references.

Keywords: laccase, *Didymocrea sp.*, isoenzyme, physico – chemical properties, kinetic properties, pH.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.-H., Cavaco-Paulo, A., and Gübitz, G.M. (2000). Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3357–3362.
2. Afreen, S., Shamsi, T.N., Baig, M.A., Ahmad, N., Fatima, S., Qureshi, M.I., Hassan, M.I., and Fatma, T. (2017). A novel multicopper oxidase (laccase) from cyanobacteria: Purification, characterization with potential in the decolorization of anthraquinonic dye. *PLoS One* 12.
3. Agrawal, K., Chaturvedi, V., and Verma, P. (2018). Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresources and Bioprocessing* 5, 4.
4. Akal, A.L., Karan, R., Hohl, A., Alam, I., Vogler, M., Grötzinger, S.W., Eppinger, J., and Rueping, M. (2018). A polyextremophilic alcohol dehydrogenase from the Atlantis II Deep Red Sea brine pool. *FEBS Open Bio* 9, 194–205.
5. Alcalde, M. (2007). Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications. In *Industrial Enzymes*, J. Polaina, and A.P. MacCabe, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 461–476.
6. Aslam, M.S., Aishy, A., Samra, Z.Q., Gull, I., and Athar, M.A. (2012). Identification, Purification and Characterization of a Novel Extracellular Laccase from *Cladosporium Cladosporioides*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 26, 3345–3350.
7. Baldrian, P. (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30, 215–242.
8. Ben Younes, S., Mechichi, T., and Sayadi, S. (2007). Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1033–1042.
9. Bertrand, B., Martínez-Morales, F., and Trejo-Hernández, M.R. (2013). FUNGAL LACCASES: INDUCTION AND PRODUCTION. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12.
10. Brijwani, K., Rigdon, A., and Vadlani, P.V. (2010). Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. *Enzyme Res* 2010.
11. C. Minussi, R., Miranda, M., A. Silva, J., V. Ferreira, C., Aoyama, H., Marangoni, S., Rotilio, D., Pastore, G., and Duran, N. (2007). Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole.
12. Dagys, M., Laurynėnas, A., Ratautas, D., Kulys, J., Vidziunaite, R., Talaikis, M., Niaura, G., Marcinkeviciene, L., Meškys, R., and Shleev, S. (2016). Oxygen electroreduction catalysed by laccase wired to gold nanoparticles via the trinuclear copper cluster. *Energy Environ. Sci.* 10.

13. Daroch, M., Houghton, C.A., Moore, J.K., Wilkinson, M.C., Carnell, A.J., Bates, A.D., and Iwanejko, L.A. (2014). Glycosylated yellow laccases of the basidiomycete *Stropharia aeruginosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 58–59, 1–7.
14. Fonseca, M.I., Ramos-Hryb, A.B., Fariña, J.I., Afanasiuk, S.S.S., Villalba, L.L., and Zapata, P.D. (2014). Effect of chemical and metallic compounds on biomass, mRNA levels and laccase activity of *Phlebia brevispora* BAFC 633. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30, 2251–2262.
15. Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., and Sannia, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*1. *Biochem. J.* 341 (Pt 3), 655–663.
16. Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., and Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 369–385.
17. González, G.M.E. (2006). Enzymatic Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by Manganese Peroxidase in Reactors Containing Organic Solvents (Univ Santiago de Compostela).
18. Goswami, P., Chinnadayala, S.S.R., Chakraborty, M., Kumar, A.K., and Kakoti, A. (2013). An overview on alcohol oxidases and their potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 4259–4275.
19. Hernández, C., Sandoval, N., Mallerman, J., García-Pérez, J., Farnet, A., ime, Gaime, I., and Alarcón Gutiérrez, E. (2015). Ethanol induction of laccase depends on nitrogen conditions of *Pycnoporus sanguineus*.
20. Ike, P.T.L., Moreira, A.C., de Almeida, F.G., Ferreira, D., Birolli, W.G., Porto, A.L.M., and Souza, D.H.F. (2015). Functional characterization of a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*. *Springerplus* 4.
21. Ikehata, K., Buchanan, I.D., and Smith, D.W. (2004). Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science* 3, 1–19.
22. Imran, M., Asad, M.J., and Hadri, S.H. Production and industrial applications of laccase enzyme. 11.
23. Johannes, C., and Majcherczyk, A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* 78, 193–199.
24. Jones, S.M., and Solomon, E.I. (2015). Electron Transfer and Reaction Mechanism of Laccases. *Cell Mol Life Sci* 72, 869–883.
25. Kaczmarek, M.B. (2017). Laccases – enzymes with an unlimited potential. 30.
26. Karaseva, E.I., Naumchik, I.V., and Metelitz, D.I. (2003). [No title found]. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 29, 43–49.
27. Kobayashi, S., and Higashimura, H. (2003). Oxidative polymerization of phenols revisited. *Progress in Polymer Science* 28, 1015–1048.

28. Kulys, J., Krikstopaitis, K., and Ziemys, A. (2000). Kinetics and thermodynamics of peroxidase- and laccase-catalyzed oxidation of N-substituted phenothiazines and phenoxazines. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 5, 333–340.
29. Kulys, J., Tetianec, L., and Ziemys, A. (2006a). Probing *Aspergillus niger* glucose oxidase with pentacyanoferrate(III) aza- and thia-complexes. *J Inorg Biochem* 100, 1614–1622.
30. Kulys, J., Vidziunaite, R., Janciene, R., and Palaima, A. (2006b). Spectroelectrochemical Study of N-Substituted Phenoxazines as Electrochemical Labels of Biomolecules. *Electroanalysis* 18, 1771–1777.
31. Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A., and Alcalde, M. (2008). Laccases and Their Applications: A Patent Review. *Recent Patents on Biotechnology* 2, 10–24.
32. M. Rivera-Hoyos, C., Morales-Álvarez, E., Poutou-Piñales, R., Pedroza-Rodríguez, A., Rodríguez Vazquez, R., and Delgado-Boada, J. (2013). Fungal Laccases.
33. Madhavi, V., and Lele, S.S. (2009). LACCASE: PROPERTIES AND APPLICATIONS. *BioResources* 4, 1694-1717–1717.
34. Mann, O. (2009a). Production, purification and characterisation of *Lamprospora wrightii* and *Botrytis aclada* laccase.
35. Mann, O. (2009b). Production, purification and characterisation of *Lamprospora wrightii* and *Botrytis aclada* laccase. PhD Thesis.
36. Marcinkevičienė, L., Vidžiūnaitė, R., Tauraitė, D., Rutkienė, R., Bachmatova, I., Morkūnas, M., Razumienė, J., Časaitė, V., Meškienė, R., Kulys, J., et al. Characterization of laccase from *Coriolorhiza versatilis* GRB13 and application of the enzyme for synthesis of redox mediators. 11.
37. Moran, G.R., Derecskei-Kovacs, A., Hillas, P.J., and Fitzpatrick, P.F. (2000). On the Catalytic Mechanism of Tryptophan Hydroxylase. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 4535–4541.
38. More, S.S., P. S., R., K., P., M., S., Malini, S., and S. M., V. (2011). Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme Res* 2011.
39. Niu, B.-L., Shen, W.-F., Liu, Y., Weng, H.-B., He, L.-H., Mu, J.-J., Wu, Z.-L., Jiang, P., Tao, Y.-Z., and Meng, Z.-Q. (2008). Cloning and RNAi-mediated functional characterization of MaLac2 of the pine sawyer, *Monochamus alternatus*. *Insect Molecular Biology* 17, 303–312.
40. Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G., and Giardina, P. (2003). Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 33, 220–230.
41. Patel, H., Gupte, S., Gahlout, M., and Gupte, A. (2014). Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. *3 Biotech* 4, 77–84.
42. Plácido, J., and Capareda, S. (2015). Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing* 2, 23.

43. Pointing, S., Jones, E.B.G., and Vrijmoed, L. (2000). Optimization of Laccase Production by *Pycnoporus sanguineus* in Submerged Liquid Culture.
44. Polaina, J., and MacCabe, A.P. (2007). Industrial enzymes: Structure, function and applications.
45. Rodríguez Couto, S., and Toca Herrera, J.L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 24, 500–513.
46. Rodríguez-Delgado, M.M., Alemán-Nava, G.S., Rodríguez-Delgado, J.M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S.O., Barceló, D., and Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 74, 21–45.
47. Rosconi, F., Fraguas, L.F., Martínez-Drets, G., and Castro-Sowinski, S. (2005). Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 800–807.
48. Saraiva, J.A., Tavares, A.P.M., and Xavier, A.M.R.B. (2012a). Effect of the Inducers Veratryl Alcohol, Xylidine, and Ligninosulphonates on Activity and Thermal Stability and Inactivation Kinetics of Laccase from *Trametes versicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 685–693.
49. Saraiva, J.A., Tavares, A.P.M., and Xavier, A.M.R.B. (2012b). Effect of the Inducers Veratryl Alcohol, Xylidine, and Ligninosulphonates on Activity and Thermal Stability and Inactivation Kinetics of Laccase from *Trametes versicolor*. *Appl Biochem Biotechnol* 167, 685–693.
50. Schellenberg, K.A., and Hellerman, L. (1958). Oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* 231, 547–556.
51. Shleev, S., Nikitina, O., Christenson, A., Reimann, C.T., Yaropolov, A.I., Ruzgas, T., and Gorton, L. (2007). Characterization of two new multiforms of *Trametes pubescens* laccase. *Bioorg. Chem.* 35, 35–49.
52. Shleev, S.V., Morozova, O.V., Nikitina, O.V., Gorshina, E.S., Rusinova, T.V., Serezhenkov, V.A., Burbaev, D.S., Gazaryan, I.G., and Yaropolov, A.I. (2004). Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie* 86, 693–703.
53. Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., and Kumar, A. (2011). Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications.
54. Upadhyay, P., Shrivastava, R., and Agrawal, P.K. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech* 6.
55. Uthandi, S., Saad, B., Humbard, M.A., and Maupin-Furlow, J.A. (2010). LccA, an Archaeal Laccase Secreted as a Highly Stable Glycoprotein into the Extracellular Medium by *Haloferax volcanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 733–743.
56. Virk, A.P., Sharma, P., and Capalash, N. (2012). Use of laccase in pulp and paper industry. *Biotechnology Progress* 28, 21–32.

57. Wang, J., Feng, J., Jia, W., Chang, S., Li, S., and Li, Y. (2015). Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement. *Biotechnol Biofuels* 8.
58. Watanabe, Y., and Nakajima, H. (2016). Chapter Twenty - Creation of a Thermally Tolerant Peroxidase. In *Methods in Enzymology*, V.L. Pecoraro, ed. (Academic Press), pp. 455–470.
59. Wellington, K. (2014). Application of Laccases in Organic Synthesis: a review. In *Green Chemistry*, pp. 167–212.
60. Wong, D.W.S. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157, 174–209.
61. Xu, L., Wang, H., and Ng, T. (2012). A laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the broth of mycelial culture of the mushroom *Lentinus tigrinus*. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2012, 536725–536725.
62. Yuan, X., Tian, G., Zhao, Y., Zhao, L., Wang, H., and Ng, T.B. (2015). Biochemical Characteristics of Three Laccase Isoforms from the Basidiomycete *Pleurotus nebrodensis*. *Molecules* 21.
63. Zhu, C., Bao, G., and Huang, S. (2016). Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ATCC 52857) induced through yeast extract and copper. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 30, 270–276.
64. Zucca, P., Cocco, G., Sollai, F., and Sanjust, E. (2016). Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes. *Biocatalysis* 1.

Poster presentation Biosynthesis, Purification and Characterization of a Newly Produced Fungal Laccases Isoenzymes from *Didymocrea* sp.

Dovilė Patlabaitė, Ingrida Radveikienė, Regina Vidžiūnaitė

Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biochemistry, Sauletekio al. 7, Vilnius, Lithuania Corresponding author: patlabaite.d@gmail.com

Abstract Laccases (E.C 1.10.3.2) are widely distributed in higher plants, bacteria, fungi and insects showing specific function in each of them. Many laccase-producing fungi secrete isoforms of the same enzyme, which can differ markedly in their stability, optimal pH and temperature, affinity for different substrates. Fungal laccases are responsible in mechanism for removing toxic phenols from the medium in which these fungi grow under natural conditions. These enzymes are able to oxidize complex polyphenol structures and similar aromatic compounds through oneelectron transfer mechanism using oxygen as oxidizing agent. Laccases have various biotechnological applications due to their strong catalytic properties. Keeping these in mind, we have initiated studies on purification and characterization of newly laccases.

J61-2 laccases electrocatalytic properties were researched previously, wired to gold nanoparticles via the trinuclear copper cluster. During enzyme purification it was noticed, that at the existing synthesis conditions *Didymocrea* sp. produces two laccase isoenzymes. In this research, both isoenzymes were extracted and characterized.

The optimum pH of enzyme activity was found at 3.5 using ABTS as substrate. J61-2 is more resistant to higher temperature, maintains most of its activity at 50°C while J61-1 nearly completely denaturates. However, J61-1 is more stable in wide pH range (4.5-7.2), which suggest potential application in bio-bleaching. J61-1 in 4 °C temperature after 25 days remained about 60% of its activity while J61-2 had only about 40%. In room temperature both isoforms activity decreased drastically.

Laccase substrate specifity and effect of pH was determined spectrophotometrically. Km values of J61-1 for ABTS, DMP are 0.4, 6.4 mM respectively, Km values of J61-2 for ABTS, DMP are 0.01, 0.98 respectively. It is assumed that purified isoenzymes potentially useful for decreasing phenol concentration in a model wastewater solution. J61-1 and J61-2 have the same optimal pH of 3.5 on PPA, but differ on syringaldazine and potassium ferrocyanide, J61-1 having optimal pH

of 7.0 and 3.5 and J61-2 having pH of 8.5 and 5.0 respectively. Moreover, the effect of metal salts on enzymatic activity was tested using ABTS as substrate. General laccase inhibitors N_3^- and Hg^{2+} , Na^+ and Zn^{2+} acetates completely inhibited both enzymes activity, but at different concentrations. The sodium sulfate caused about 60 % inhibition of J61-2 activity but increased J61-1. The binding of halides (such as NaN_3) to the types 2 and 3 copper sites effect internal electron transfer, thus inhibiting the activity of the laccase.

Keywords: laccase, properties, oxidation.

ISSN:2335-8653 ONLINE ISSN: 2335-8718