



Reakcje katalizowane przez lakazę – mechanizm i zastosowanie w biotechnologii

Jolanta Polak, Anna Jarosz-Wilkołazka

Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Laccase-mediated reactions – mechanism and biotechnology applications

Summary

Laccases catalyze oxidative conversion of a broad range of substrates such as phenols or lignin-derivatives. They also have an ability to induce oxidative coupling reactions of the free radical intermediates to related phenolic structures. The application of laccases-mediated coupling reactions in white biotechnology represents a promising alternative to chemical synthesis of products of commercial importance. The goal of this review was to present potential application of fungal laccases, focusing specifically on their use as biocatalysts in environmental friendly synthesis of new molecules.

Key words:

laccase, coupling reaction, white biotechnology.

1. Wprowadzenie

Biotechnologia przemysłowa nazywana również białą biotechnologią jest podstawową technologią praktycznego zastosowania komórek lub ich komponentów (np. enzymów) do produkcji substancji chemicznych, tworzyw oraz artykułów powszechnego użytku. Właściwości katalityczne wielu enzymów z grupy oksydoreduktaz wykorzystane są już w procesach technologicznych związanych z przemysłem tekstylnym, produkcją żywności oraz z diagnostyką medyczną (1,2). Na szczególną uwagę zasługują reakcje katalizowane przez lakazy, które wykazują ogromny

Adres do korespondencji

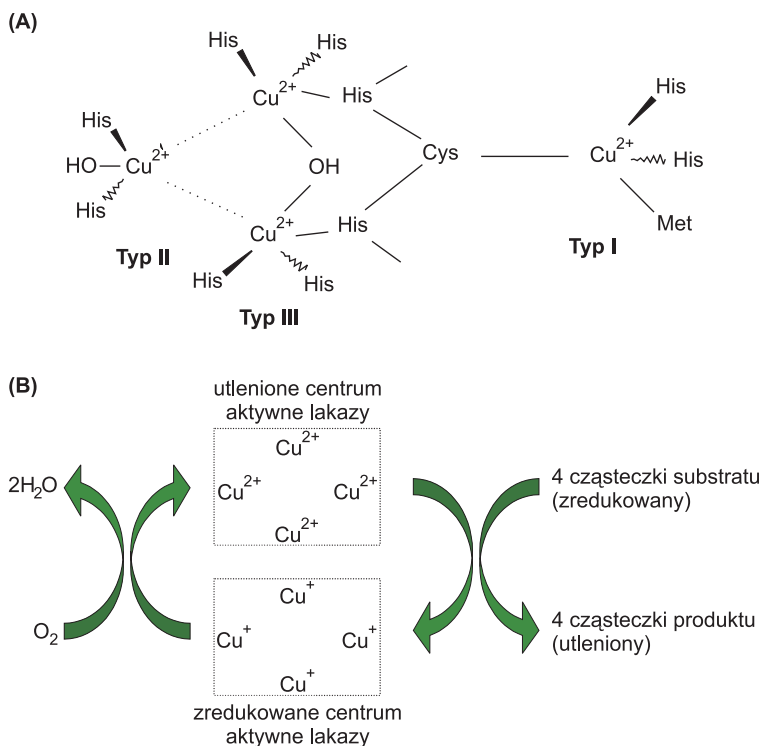
Jolanta Polak,
Zakład Biochemii,
Uniwersytet
Marii Curie-Skłodowskiej,
Pl. Marii
Curie-Skłodowskiej 3,
20-031 Lublin.

potencjał aplikacyjny w syntezie nowych struktur chemicznych bądź w przekształceniach istniejących związków chemicznych, co jest alternatywą dla syntezy chemicznej.

2. Budowa i mechanizm działania lakazy

Lakazy (EC 1.10.3.2) należą do szeroko rozpowszechnionych w świecie oksydo-reduktaz występujących m. in. w roślinach wyższych (3-6), u większości grzybów (7) oraz w niektórych bakteriach (8-10). Enzymy te katalizują utlenianie szerokiego spektrum związków organicznych i nieorganicznych, któremu towarzyszy redukcja tlenu cząsteczkowego do wody.

Centrum aktywne enzymu zawiera 4 sąsiadujące ze sobą atomy miedzi, które reprezentują 3 typy wyróżnione ze względu na swoje specyficzne właściwości (rys. 1A). Typ I miedzi, którego forma utleniona wykazuje absorpcję przy długości fali 610 nm, nadaje niebieski kolor cząsteczce enzymu (lakaza nazywana jest niebieską oksydazą) oraz jest miejscem utleniania substratu. Miedź typu II i dwa atomy miedzi typu III tworzą trójatomowy zespół, w którym zachodzi wiązanie i redukcja tlenu



Rys. 1. A – Centrum katalityczne lakazy (12) oraz B – schemat cyklu katalitycznego lakazy (11).

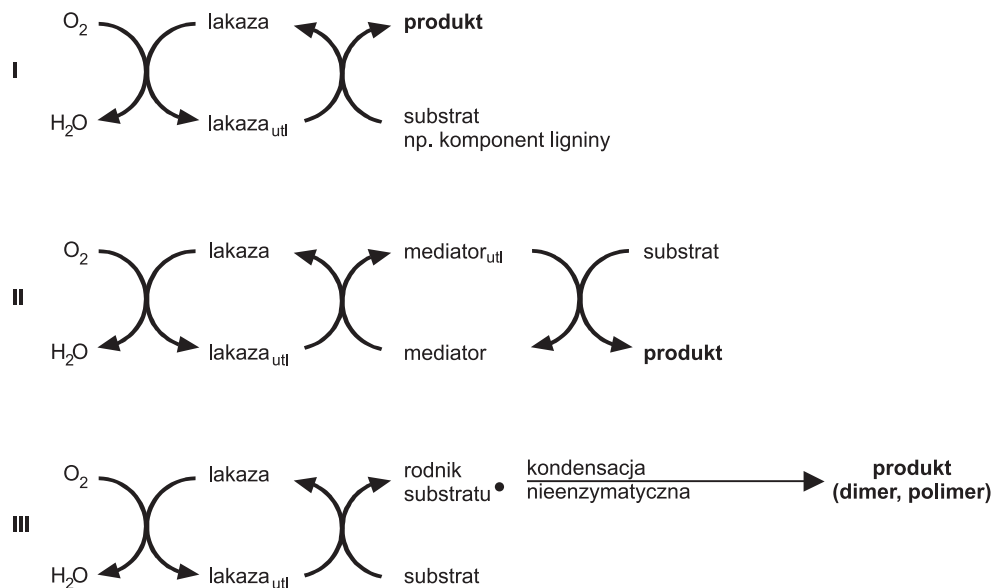
cząsteczkowego do wody. W trakcie utleniania substratu powstają reaktywne rodniki, które następnie mogą być substratami dla reakcji nieenzymatycznych. Podczas każdego cyklu katalitycznego dochodzi do redukcji 1 cząsteczki tlenu do 2 cząsteczek wody, towarzyszącej utlenieniu 4 cząsteczek substratu do 4 rodników substratów (rys. 1B) (7,11,12). W analizie spektroskopowej elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) centrum aktywnego lakazy wykazano charakterystyczne właściwości atomów miedzi: aktywność paramagnetyczną dla miedzi typu I i typu II oraz brak sygnału dla typu III jako skutek antyferromagnetycznego sprzężenia pary atomów miedzi typu III.

Lakazy pochodzenia roślinnego są białkami wydzielanymi do apoplastu (13), gdzie biorą udział w syntezie ligniny i regeneracji uszkodzonych tkanek. Pierwszą opisaną lakazą był enzym wyizolowany z japońskiego drzewa *Rhus vernicifera* (14). Lakazy roślinne wykazują niskie wartości potencjału oksydoredukcyjnego dla atomu miedzi typu I, które wynoszą około 430 mV (względem normalnej elektrody wodoro-
rowej, NEW) (15).

Istotną cechą lakaz grzybowych jest obecność fragmentu cukrowego (od 10 do 45%), który zabezpiecza lakazy przed działaniem enzymów proteolitycznych (16,17). U większości grzybów wyższych, szczególnie ligninolitycznych grzybów białej zgnilizny z klasy *Basidiomycetes* i *Ascomycetes*, występują wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe izoformy lakazy (7). Potencjał oksydoredukcyjny atomu miedzi typu I lakaz grzybowych wykazuje wartości średnie lub wysokie wynoszące na przykład około 780 mV (względem NEW) w przypadku lakaz z gatunków należących do rodzaju *Trametes* (15,18). Naturalne funkcje lakaz grzybowych to przede wszystkim udział w degradacji kompleksu ligninowego drewna, morfogenezie grzybów, w procesie melanizacji oraz w procesie tworzenia zarodników (19-21).

3. Reakcje katalizowane przez lakazę i ich zastosowanie

Reakcje katalizowane przez lakazę możemy podzielić na trzy grupy: reakcje utleniania prostych pochodnych fenolowych bez udziału mediatora (rozdz. 3.1), utlenianie substratów wymagające dodatkowej obecności związku tzw. mediatora (rozdz. 3.2) oraz reakcje sprzęgania (rozdz. 3.3) (rys. 2).



Rys. 2. Rodzaje mechanizmów reakcji katalizowanych przez lakazę, I – utlenianie pochodnych fenolowych bez udziału mediatora, II – utlenianie substratów wymagające mediatora, III – reakcje sprzęgania.

3.1. Utlenianie substratów bez udziału mediatora

Do pierwszej grupy reakcji zaliczamy utlenianie prostych związków organicznych takich jak mono-, di- i polifenole oraz ich pochodnych zawierających aminowe, karboksylowe, metoksyłowe i sulfonowe grupy funkcyjne. Mechanizm reakcji bezpośredniego utleniania substratów przez lakazy obejmuje odszczepienie protonu wodoru od grupy hydroksylowej substratu fenolowego i przekształcenie go w rodnik fenoksyłowy. Uwolnione elektrony są przekazywane kolejno na atom miedzi typu I, trójatomowy zespół miedzi typu II i typu III centrum aktywnego lakazy i wreszcie na tlen cząsteczkowy powodując jego redukcję do wody. Powstałe rodniki fenoksyłowe są bardzo nietrwałe i mogą ulegać enzymatycznemu utlenieniu do chinonów lub nieenzymatycznemu uwodornieniu i polimeryzacji (7,22).

W warunkach naturalnych mechanizm ten jest wykorzystywany przez rośliny wyższe w reakcjach polimeryzacji składników ściany komórkowej w obecności tlenu, w procesach syntezy polimeru ligninowego jak i w procesie regeneracji ścian komórkowych w miejscach uszkodzeń tkanki roślinnej (23). Sugeruje się ponadto, że rolę chinonów powstałych w wyniku utleniania fenoli przez lakazę jest obrona roślin przed patogenami (23). W odróżnieniu od lakaz roślinnych lakazy grzybowe we współpracy z innymi enzymami odpowiedzialne są za proces rozkładu polimeru ligninowego drewna, jaki ma miejsce w środowisku naturalnym (24). Jednakże dość wysoki potencjał oksydoredukcyjny lakaz grzybowych pozwala na bezpośrednie

utlenienie wyłącznie małych cząsteczek fenolowych stanowiących nie więcej niż 10% polimeru ligninowego (25).

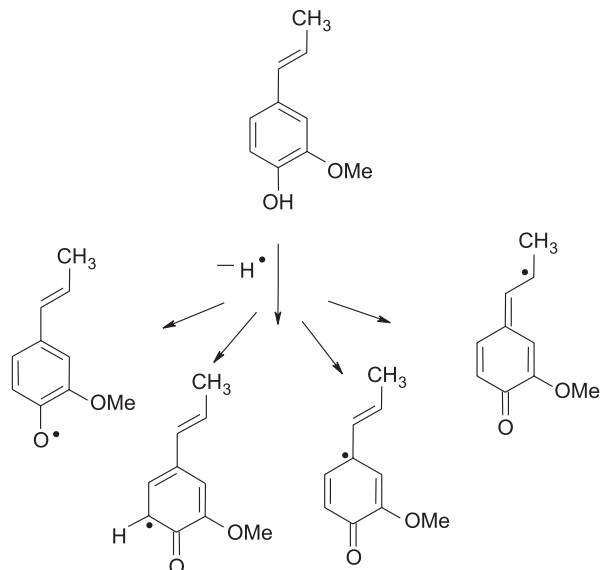
3.2. Utlenianie substratów z udziałem mediatorów

Mechanizm utleniania pochodnych aromatycznych zależy w dużym stopniu od różnicy potencjału oksydoredukcyjnego między substratem a atomem miedzi typu I lakazy oraz od rozmiaru cząsteczki substratu. W przypadku cząsteczek wykazujących wysoki potencjał oksydoredukcyjny (np. związki niefenolowe, aminy aromatyczne) oraz w przypadku dużych cząstek (np. cząsteczka kompleksu ligniny), które nie są w stanie penetrować centrum aktywnego enzymu (21,26), utlenienie możliwe jest dzięki tzw. mediatorom reakcji, czyli związkom niskocząsteczkowym zawierającym specyficzne grupy funkcyjne (np. $-\text{NO}$, $-\text{NOH}$, $-\text{HRNOH}$) i pośredniczącym w przekazywaniu elektronów z substratu do centrum aktywnego lakazy. Mechanizm tej reakcji obejmuje dwa etapy: 1) utlenienia mediatora z grupą N-hydroksylową do wolnego rodnika kationu N-O^+ , formy bardziej stabilnej niż odpowiednik fenoksylowy oraz 2) utlenienia substratu z jednoczesną redukcją cząsteczki mediatora. Do najczęściej używanych mediatorów zalicza się m.in. hydroksybenzotriazol (HBT), kwas hydroksyantranilowy (HAA), kwas syringowy, 2,2,6,6-tetrametylopiperodynę-1-oksyl (TEMPO), sól diamonową 2,2'-azyno-bis [3-etylbenzotiazoliny-6-kwasu sulfonowego] (ABTS), kwas wiolurowy, hydroksyacetonilid (NHA), hydroksyftalimid (HPI).

Głównym enzymem biorącym udział w rozkładzie ligniny przez grzyby białej zgnilizny drewna jest właśnie lakaza, która współdziała z prostymi fenolami obecnymi w środowisku reakcji (np. kwas weratrowy, kwas 3-hydroksyantranilowy). Związki te są produktami reakcji depolimeryzacji ligniny, które w tym układzie działają jako naturalne mediatory (27). Zastosowanie tych mediatorów w utlenianiu specyficznych substratów przez lakazę może być jedną z metod stosowanych w procesie delignifikacji i wybielaniu pulpy drzewnej oraz usuwaniu zanieczyszczeń wytwarzanych przez przemysł drzewny i papierniczy (28-31). Wiele uwagi środowisk naukowych jest skierowane na wykorzystanie systemu reakcji lakaza/mediator do syntezy organicznej (32,33), jak również w procesach oczyszczania środowiska naturalnego z zanieczyszczeń poфарbiarskich poprzez degradację lub sprzęganie barwników (34-36), utlenianie policyklicznych węglowodorów aromatycznych (37,38), degradację pestycydów i insektycydów (39,40).

3.3. Reakcje sprzęgania reaktywnych intermediatów

Reakcja sprzęgania (ang. *coupling reaction*) jest trzecim typem reakcji katalizowanych przez lakazę. Bezpośrednie utlenianie substratów fenolowych generuje powstanie intermediatów o charakterze reaktywnych i bardzo niestabilnych rodników,



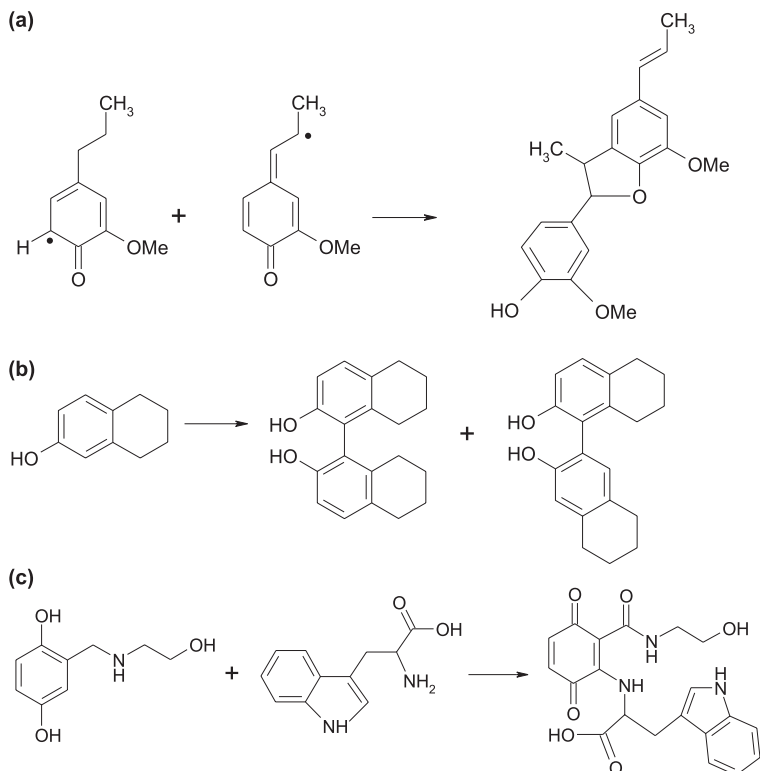
Rys. 3. Powstawanie czterech form mezomerycznych rodników w wyniku działania lakazy na izoeugenol (42).

które mogą w procesie nieenzymatycznej, spontanicznej reakcji sprzęgania (uwodnienia, polimeryzacji, utleniania lub redukcji) łączyć się ze sobą tworząc nowe struktury fenolowe o postaci dimerów, oligomerów, a nawet polimerów. Enzymatyczne przekształcenie niskocząsteczkowych rodników fenolowych jest obiecującą alternatywą dla syntezy zarówno znanych jak i nowych związków o określonych właściwościach fizykochemicznych albowiem wymaga łagodnych warunków środowiska reakcji enzymatycznej. Użycie lakazy w syntezie organicznej może przyczynić się do zmniejszenia kosztów przy jednoczesnym zachowaniu dużej wydajności procesu, który jest bardziej przyjazny środowisku naturalnemu.

Wyróżnia się homo- i heterocząsteczkowe sprzęganie wolnych rodników, w którym biorą udział te same bądź różne molekuły. Uważa się, że nowo powstałe cząsteczki są wynikiem sprzęgania aktywnych form rodników fenolowych poprzez wiązania węgiel-węgiel (C-C) i węgiel-tlen (C-O) oraz sprzęgania amin aromatycznych poprzez wiązania węgiel-azot (C-N) lub azot-azot (N-N) (41). Na rysunku 3 przedstawiono przykład powstawania czterech różnych mezomerów rodników w wyniku deprotonacji izoeugenolu przez lakazę. W dalszym etapie te reaktywne cząsteczki oddziałują między sobą przekształcając się w dimery i tetramery (42).

Powstanie nowych wiązań w reakcji sprzęgania może zachodzić w wyniku tworzenia wiązań pomiędzy:

1) węglem i tlenem (C-O) np. formowanie 4 mezomerów rodników izoeugenolu lub alkoholu koniferylowego wynikające z deprotonacji grupy hydroksylowej, rekombinacji między mezomerami, oraz homodimeryzacji węgiel-tlen (42); powstanie



Rys. 4. Przykłady reakcji sprzęgania cząsteczek poprzez tworzenie wiązań C-O, C-C i C-N; (a) C-O homodimeryzacja izoeugenolu (42), (b) C-C homodimeryzacja tetrahydro-2-naftolu (46), (c) N-C heterosprzęganie L-tryptofanu z 2,5-dihydroksy-N-(2-hydroksyetylo)-benzamidem (48).

dimerów 17 β -estradiolu (43), synteza dimerów w reakcji 2-hydroksydifenylu i eteru 2-hydroksybifenylu (44),

2) węglem i węglem (C-C) poprzez formowanie kationu rodnika w wyniku deprotonacji grup hydroksylowych cząsteczek estrów, a następnie ich dimeryzacji i rearomatyzacji (45), w ten sposób powstają np. dimery tetrahydro-2-naftolu (46), dimer 2-hydroksydifenylu i eteru 2-hydroksybifenylu (44), dimer bisfenolu A (47), dimery 17 β -estradiolu (43),

3) węglem-azotem (C-N) poprzez formowanie kationu rodnika w wyniku deprotonacji grup hydroksylowych oraz jego reakcji z grupą aminową pochodnych fenolowych, np. tryptofanu (48), kwasu 4-aminobenzoesowego i heksylaminy (49,50), nukleofilowej reakcji hydrazonu 3-metylo-2-benzotiazolinowego (MBTH) z różnymi metoksyfenolami (51) lub w wyniku kondensacji reaktywnego kationu MBTH z kwasem 3-dimetyloaminobenzoesowym w reakcji powstawania barwnika „indaminy”(52).

Przykłady reakcji homo- i heteromolekularnego sprzęgania cząsteczek przedstawiono na rysunku 4.

Reakcje syntezy nowych związków w procesach przyjaznych środowisku naturalnemu stały się obiektem badań w wielu ośrodkach naukowych. Wiedza na temat mechanizmu powstawania wolnych rodników fenolowych oraz zintensyfikowanie badań nad nieenzymatycznymi procesami zachodzącymi w środowisku reakcji, doprowadziły do pojawienia się licznych doniesień na temat reakcji sprzęgania katalizowanych przez lakazę (tab. 1). Na uwagę zasługuje katalizowana przez lakazę modyfikacja związków toksycznych powszechnie obecnych w ściekach przemysłowych. Proces ten odbywa się albo poprzez ich dimeryzację, np. dimeryzacja bisfenolu A (47), dimeryzacja toksycznych pochodnych biarylowych (44) albo sprzęganie z innymi substancjami, np. barwniki azowe (53), chloroanilina (54,55), 2,4,6-trinitrotoluen i jego pochodne (56-58), enzymatyczna modyfikacja ligniny za pomocą prostych fenoli (59).

Tabela 1

Przykłady reakcji sprzęgania związków katalizowane przez lakazę

Substraty reakcji sprzęgania	Wiązanie	Produkt	Literatura
1	2	3	4
sprzęganie heteromolekularne			
związki dihydroksylowane z kwasem 4-aminobenzoesowym	N-C	dimer, struktura chinonowa	(64)
hydrazon 3-metylo-2-benzotiazolinowy i metoksyfenole	N-C	barwnik azowy	(51)
kwas 3-(3,4-dihydroksyfenilo) propionowy i kwas 4-aminobenzoesowy	N-C	dimer pochodny kwasu propionowego	(49,50)
kwas 4-metylo-3-hydroksyantranilowy	N-C, C-O	aktynomocyna zawierająca chromofor fenokszynowy	(63)
hydrazon 3-metylo-2-benzotiazolinowy i kwas 3-dimetyloaminobenzoesowy	N-C	barwnik – indamina	(52)
L-tryptofan z 2,5-dihydroksy-n-(2-hydroksyetylo)-benzamidem	N-C	chinoid	(48)
<i>p</i> -hydrochinony i 1-rzędowe aminy aromatyczne	N-C	mono- i diaminochinony	(77)
n-(2-alkilamino-4-fenylimidazolo-1-yl)-acetamid	N-C	2 produkty heteromolekularne i 1 produkt niepięścienny	(73)
gwajakol z 2,4-diamino-6-nitrotoluenem	N-C	5-(2-amino-3-metylo-4-nitroanilino)3,3'-dimetoksy-4,4'-difenoquinon	(57)
kwas 2,5-diaminobenzenosulfonowy i katechol	N-C	dimery	(75)
3,4-dichloroanilina z kwasem ferulowym	bd	trimery z 1 cząsteczki aniliny i 2 cząsteczek kwasu	(54)
chloroanilina z kwasem protokatechowym, waniolinowym i syryngowym	bd	heterodimery	(55)
mitramycyna i jej pochodne z <i>p</i> -hydrochinonem	bd	mitramycyno-hydrochinon i chromomycyno-hydrochinon	(78)
katechina z <i>p</i> -hydrochinonem	bd	pochodne katechyno-hydrochinonowe	(79)
pochodne 2,4,6-trinitrotolenu z kwasem ferulowym, kwasem syryngowym, katecholem, gwajakolem	bd	nierozpuszczalne produkty	(56)

2,4,6-trinitrotoluen z katecholem	bd	nierozpuszczalne produkty	(58)
lignina i rozpuszczalne w wodzie fenole z podstawnikami karboksy- i sulfoksy-	bd	lignina rozpuszczalna w środowisku kwaśnym	(59)
barwniki azowe	bd	mieszanina związków azowych	(53)
sprzęganie homomolekularne			
eter-2-hydroksydifenylowy i 2-hydroksybifenyl	C-C	dimery	(44)
ester salicylowy	C-C	pochodne biarylowe	(45)
tetrahydro-2-naftol	C-C	dimery	(46)
bisfenol A (BPA)	C-C	dimer	(47)
rezweratrol	C-C	transdehydrodimery	(61)
izo Eugenol i alkohol koniferylowy	C-O, C-C	odpowiednio: dimery i tetramery, oligomery i polimery	(42)
17 β -estradiol	C-C, C-O	dimery, które mogą przekształcać się w oligomery i polimery	(43)
kwas ferulowy	bd	dihydrodimer	(62)
penicylina X	bd	dimery	(60)

bd – brak danych

Temperatura inkubacji oraz pH buforu podczas reakcji sprzęgania zależą w głównym stopniu od źródła użytej lakazy (tab. 2). Dla wielu lakaz grzybowych otrzymanych z gatunków należących do rodzaju *Trametes*, *Pycnoporus*, *Coriolus*, *Rhizoctonia*, optymalne temperatury inkubacji mieszaniny reakcyjnej kształtują się w przedziale od temperatury pokojowej do 30°C, w buforach o pH 4,5 lub 5. Dla poszczególnych lakaz są to wartości odpowiednio: 28°C i pH 6,5 dla *Pyricularia oryzae* (57), 45°C i pH 6,5 dla *Myceliophthora* sp. (43,60), 45°C i pH 6,9 dla *Rhizoctonia praticola* (54,55).

Mała rozpuszczalność w wodzie wielu potencjalnych substratów lakazy zwiększa zainteresowanie zastosowaniem niekonwencjonalnych środowisk reakcji z małą zawartością wody. Reakcja sprzęgania w większości przypadków odbywa się w roztworach wodnych buforowanych i tylko nieliczne reakcje mają miejsce w wodnych roztworach rozpuszczalników organicznych. Przykładem mogą być reakcje utleniania estradiolu i rezweratrolu, w których zostały wykorzystane 3 różne systemy rozpuszczalników: dioksan – toluen nasycony buforem Tris, dwufazowy system octan etylu – bufor octanowy oraz chloroform – MnO₂ (43,61). Setti (1999) prowadził reakcję sprzęgania hydrazonu 3-metylo-2-benzotiazolinowego (MBTH) i metoksyfenoli w roztworze woda-aceton (81:19), natomiast Mustafa (2005) utleniał kwas ferulowy w wodno-organicznym systemie dwufazowym octan etylu – 20% bufor sodowo-fosforanowy (51,62). Podobne środowisko reakcji czyli bufor fosforanowy zawierający 60% acetonitryl, zastosowano do otrzymania chromoforu fenoksazyнового (63). Największą wydajność procesu syntezy wynoszącą 80% uzyskano w reakcjach heteromolekularnego sprzęgania kwasu 4-aminobenzoowego i kwasu dihydrokofeinowego (50), oraz kwasu 4-aminobenzoowego ze związkami dihydroksylowanymi (64).

Tabela 2

Przykłady organizmów, których lakazy były używane w reakcjach sprzęgania

Źródło lakazy	Literatura
<i>Trametes villosa</i>	(47,53,58,59,64,75)
<i>Trametes versicolor</i>	(57,60,63,73)
<i>Trametes pubescens</i>	(43,61)
<i>Trametes modesta</i>	(56)
<i>Trametes</i> sp.	(77)
<i>Pyricularia oryzae</i>	(51,57)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	(44,45,48,49,50)
<i>Pycnoporus coccineus</i>	(42)
<i>Coriolus birsutus</i>	(52)
<i>Rhizoctonia praticola</i>	(54,55)
<i>Polyporus anceps</i>	(78)
<i>Rhus vernicifera</i>	(79,42)
<i>Myceliophthora thermophyla</i>	(61,62,77)
<i>Myceliophthora</i> sp.	(43)

4. Przykłady praktycznego zastosowania lakaz

Zdolność lakazy do bezpośredniego utleniania fenoli i innych związków aromatycznych stała się obiektem zainteresowania wielu badaczy na świecie. W ostatnio przeprowadzonych badaniach wskazuje się na ogromny potencjał zastosowania lakazy w takich procesach jak detoksyfikacja i biodegradacja zanieczyszczeń znajdujących się w odpadach naturalnych lub wytwarzanych przez przemysł drzewny (65) oraz enzymatyczny rozkład odpadowych substancji barwnych pochodzących z przemysłu tekstylnego i papierniczego (66-70). Lakaza może być również stosowana w przemyśle spożywczym w produkcji soków i alkoholi, gdyż ma zdolność do usuwania niepożądanych pochodnych fenolowych występujących w zbyt dużych stężeniach w sokach owocowych oraz w winie. Utlenienie, polimeryzacja, a następnie wytrącanie substancji fenolowych wpływa na poprawę klarowności, smaku, aromatu i koloru tych produktów (71). Dowiedziono również, że katalizowane przez lakazę utlenianie komponentów fenolowych obecnych w ekstrakcie ligninocelulozy, będących naturalnymi inhibitorami fermentacji alkoholowej, wyraźnie wpływa na wzrost wydajności produkcji etanolu z ligninocelulozy z udziałem drożdży (72).

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem lakazy jako biokatalizatora w syntezie organicznej. Powiodły się próby syntezy naturalnych pochodnych związków takich jak penicylina X (60), rezweratrol i estradiol (61,43), których dimerowe pochodne mogą pełnić równie ważne funkcje podobnie jak substraty, z których powstały. Nieenzymatyczne przekształcenie wolnych rodników w barwne struktury fenolowe stwarza warunki dla enzymatycznej syntezy różnych barwników

takich jak barwniki azowe (51), indaminy (52), dimery kwasu ferulowego (62). Kolejnym przykładem jest uzyskanie związków zawierających chromofor fenoksazynowy należący do aktynomycyn, w wyniku homomolekularnej dimeryzacji pochodnych kwasu antranilowego (63). Na szczególne zainteresowanie przemysłu farmaceutycznego zasługuje możliwość wykorzystania lakazy w heteromolekularnych reakcjach sprzęgania pochodnych imidazoli (73), kwasu 3-(3,4-dihydroksyfenylo)-propionowego, który jest naturalnym związkiem antywirusowym (74), pochodnych *p*-dihydroksyloowanych z kwasem 4-aminobenzoowym (64) lub *p*-hydrochinonu z L-tryptofanem (48) czy mitramycyną (75). Przytoczone przykłady reakcji stwarzają nowe perspektywy dla syntezy nietoksycznych leków. Przekształcanie isoeugenolu i alkoholu koniferylowego w dimery i tetramery (42), dimeryzacja estrów salicylowych (45) to kolejne przykłady wykorzystania lakazy w reakcjach syntezy.

Pomimo zaangażowania tak wielu zespołów naukowych badających lakazy i możliwości ich wykorzystania, komercyjnie dostępne są zaledwie dwa preparaty lakazowe: „Suberase” i „DeniLite” firmy Novozymes. „Suberase” jest stosowana w przemyśle w procesie produkcji korków winiarskich, ponieważ katalizuje polimeryzację składników fenolowych naturalnych korków, usuwając z nich gorycz, cierpkość i zapach, które niekorzystnie wpływają na właściwości wina (74). Drugi preparat lakazowy to preparat „DeniLite” (Novozym 51003), który powszechnie jest stosowany do odbarwiania takich tkanin jak bawełna czy jeans. Coraz częściej lakaza stosowana jest *in situ*, umożliwiając przekształcanie prekursorów barwników w przesiąkniętych substratami tkaninach. Prowadzi to do mocniejszego zakotwiczenia barwników na włóknach oraz zwiększenia wydajności procesu barwienia z jednoczesnym zmniejszeniem zużycia związków chemicznych (76).

5. Podsumowanie

Lakaza jako enzym o niskiej specyficzności substratowej, utlenia różnorodne związki chemiczne od mono- i difenoli po związki o charakterze nieorganicznym. Synteza wielu związków farmaceutycznych, dodatków do żywności czy też polimerów, została przeprowadzona przy użyciu lakazy w laboratoriach wielu ośrodków naukowych. Szerokie spektrum substratowe oraz różne typy reakcji katalizowanych przez lakazy dają pole do wykorzystania tej uniwersalnej oksydoreduktazy w różnych typach procesów technologicznych spełniających kryteria białej biotechnologii, z której płyną niewątpliwie same korzyści takie jak oszczędność wody, energii i surowców.

Literatura

1. Xu F., (2005), *Ind. Biotechnol.*, 1, 38-50.
2. Hoegh L., (2004), PCT patent WO 2004091312-A1.
3. Huttermann A., Mai C., Kharazipour A., (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 387-394.

4. Dean J. F. D., Eriksson K-E. L., (1994), *Holzforschung*, 48, 21-33.
5. Bligny R., Douce R., (1983), *Biochem. J.*, 209, 489-496.
6. Gregory R. P., Bendall D. S., (1996), *Biochem. J.*, 1001, 569-581.
7. Thurston C. F., (1994), *Microbiology*, 140, 19-26.
8. Alexandre G., Zhulin I. B., (2000), *Trends Biotechnol.*, 18, 41-42.
9. Claus H., Filip Z., (1997), *Microbiol. Res.*, 152, 209-216.
10. Givaudan A., Deffosse A., Faure D., Potier P., Bouillant M. L., Bally R., (1993), *FEMS Microbiol. Lett.*, 108, 205-210.
11. Claus H., (2004), *Micron*, 35, 93-96.
12. Solomon E. I., Sundaran U. M., Machonkin T. E., (1996), *Chem. Rev.*, 96, 2563-2605.
13. La Fayette P. R., Ericsson K-E. L., Dean J. F. D., (1999), *Plant. Mol. Biol.*, 40, 23-35.
14. Yoshida H., (1883), *J. Chem. Soc.*, 43, 472-486.
15. Reinhammar B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, 275, 245-259.
16. Yoshitake A., Katayama Y., Nakamura M., Iimura Y., Kawai S., Moroshi N., (1993), *J. Gen. Microbiol.*, 139, 179-185.
17. Claus H., (2003), *Arch. Microbiol.*, 179, 145-150.
18. Xu F., Shin W., Brown S. H., Waleithner J. A., Sundaram U. M., Solomon E. I., (1996), *Biochim. Biophys. Acta*, 1292, 303-311.
19. Herman T. E., Kurtz M. B., Champe S. P., (1983), *J. Bacteriol.*, 154, 955-964.
20. Kuznetsov V. D., Filippova S. N., Rybakova A. M., (1984), *Mikrobiologia*, 53, 251-256.
21. Bourbonnais R., Paice M. G., (1990), *FEBS Lett.*, 267, 99-102.
22. Yarpolov A. I., Skorobogatko O. V., Vartanov S. S., Varfolomeyev S. V., (1994), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 49, 257-280.
23. de Marco A., Roubelakis-Angelakis K. A., (1997), *Phytochemistry*, 46, 362-366.
24. Breen A., Singleton F. L., (1999), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 252-258.
25. Martinez A. T., Speranza M., Ruiz-Duenas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martinez M. J., Gutierrez A., del Rio J. C., (2005), *Int. Microbiol.*, 8, 195-204.
26. Eggert C., Temp U., Dean J. F., Eriksson K. E., (1996), *FEBS Lett.*, 391, 144-148.
27. Bourbonnais R., Paice M. G., (1996), *Tappi J.*, 79, 199-204.
28. Call H. P., Mucke I., (1997), *J. Biotechnol.*, 53, 163-202.
29. Crestini C. L., Argyropoulos D. S., (1998), *Bioorg. Med. Chem.*, 6, 2161-2169.
30. Kandioller G., Christov L., (2001), *Oxidative delignification chemistry fundamentals and catalysis. ACS Symposium Series*, Ed. Argyropoulos D. S., 785, 427-443, Oxford University Press, USA.
31. Archibald F. S., Bourbonnais R., Jurasek L., Paice M. G., Reid I. D., (1997), *J. Biotechnol.*, 53, 215-236.
32. Fritz-Langhals E., Kunath B., (1998), *Tetrahedron Lett.*, 39, 5955-5956.
33. Potthast A. T., Rosenau C. L., Chen C. L., Gratzl J. S., (1996), *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 108, 5-9.
34. Soares G. M. B., Pessoa de Amorim M. T., Costa-Ferreira M., (2001), *J. Biotechnol.*, 89, 123-129.
35. Schneider P., Pedersen A. H., (1995), PCT world patent WO 95/01/01426.
36. Rodrigues Couto S., Sanroman M. A., Gubitz G. M., (2005), *Chemosphere*, 58, 417-422.
37. Majcherzyk A., Johannes C., (2000), *Biochim. Biophys. Acta*, 1474, 157-162.
38. Johannes C. A., Majcherzyk A., Huttermann A., (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 313-317.
39. Mougin C., Jolivald C., Malosse C., Chaplain V., Sigoillot J. C., Asther M., (2002), *Polycyclic Aromat. Compd.*, 22, 673-688.
40. Amitai G. R., Adani R., Sod-Moriah G., Rabinovitz I., Vincze A., Leader H., Chefetz B., Leibovitz-Per-sky L., (1998), *FEBS Lett.*, 438, 195-200.
41. Gianfreda L., Xu F., Bollag J-M., (1999), *Biorem. J.*, 3, 1-25.
42. Shiba T., Xiao L., Miyakoshi T., Chen C-L., (2000), *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 10, 605-615.
43. Nicotra S., Intra A., Ottolina G., Riva S., Danieli B., (2004), *Tetrahedron: Asymmetry*, 15, 2927-2931.
44. Jonas U., Hammer E., Haupt E. T. K., Schauer F., (2000), *Arch. Microbiol.*, 174, 393-398.
45. Ciecholewski S., Hammer E., Manda K., Bose G., van Nguyen T. H., Langer P., Schauer F., (2005), *Tetrahedron*, 51, 4615-4619.

46. Intra A., Nicotra S., Riva S., Danieli B., (2005), *Adv. Synth. Catal.*, 347, 973-977.
47. Uchida H., Fukuda T., Miyamoto H., Kawabata T., Suzuki M., Uwajima T., (2001), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287, 355-358.
48. Manda K., Hammer E., Mikolasch A., Gördes D., Thurow K., Schauer F., (2006), *Amino Acids*, 31, 409-419.
49. Mikolasch A., Hammer E., Jonas U., Popowski K., Stielow A., Schauer F., (2002), *Tetrahedron*, 58, 7589-7593.
50. Piltz R., Hammer H., Schauer F., Kragl U., (2003), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 708-712.
51. Setti L., Giuliani S., Spinozzi G., Pifferi P. G., (1999), *Enzyme Microb. Technol.*, 25, 285-289.
52. Baker W. L., Sabapathy K., Vibat M., Lonergan G., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 90-94.
53. Zille A., Górnacka B., Rehorek A., Cavaco-Paulo A., (2005), *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 6711-6718.
54. Tatsumi K., Freyer A., Minard R. D., Bollag J-M., (1994), *Environ. Sci. Technol.*, 28, 210-215.
55. Tatsumi K., Freyer A., Minard R. D., Bollag J-M., (1994), *Soil Biol. Biochem.*, 26, 735-742.
56. Nyanhongo G. S., Rodríguez Couto S., Guebitz G. M., (2006), *Chemosphere*, 64, 359-370.
57. Dawel G., Kastner M., Michels J., Poppitz W., Gunther W., Fritsche W., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2560-2565.
58. Thiele S., Fernandes E., Bollag J-M., (2002), *J. Environ. Qual.*, 31, 437-444.
59. Lund M., Ragauskas A. J., (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 699-703.
60. Agematu H., Tsuchida T., Kominato K., Shibamoto N., Yoshioka T., Nishida H., Okamoto R., Shin T., Murao S., (1993), *J. Antibiot.*, 46, 141-148.
61. Nicotra S., Cramarossa M. R., Mucci A., Pagnoni U. M., Riva S., Forti L., (2004), *Tetrahedron*, 60, 595-600.
62. Mustafa R., Muniglia L., Rovel B., Girardin M., (2005), *Food. Res. Int.*, 38, 995-1000.
63. Osiadacz J., Al-Adhami A. J. H., Bojraszewska D., Fischer P., Peczyńska-Czoch W., (1999), *J. Biotechnol.*, 72, 141-149.
64. Manda K., Hammer E., Mikolasch A., Niedermeyer T., Dec J., Jones A. D., Benesi A. J., Schauer F., Bollag J-M., (2005), *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 35, 86-92.
65. Bajpai P., (1999), *Biotechnol. Prog.*, 15, 147-157.
66. Michniewicz A., Ledakowicz S., Jamroz T., Jarosz-Wilkolazka A., Leonowicz A., (2003), *Biotechnologia*, 4, 194-203.
67. Rodrigues Couto S., Sanroman M. A., (2003), *J. Food. Eng.*, 71, 208-213.
68. Palmieri G., Cennamo G., Sannia G., (2005), *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 17-24.
69. Rodriguez E., Pickard M. A., Vazquez-Duhalt R., (1999), *Curr. Microbiol.*, 38, 27-32.
70. Zille A., Tzanov T., Guebitz G. M., Cavaco-Paulo A., (2003), *Biotechnol. Lett.*, 25, 1473-1477.
71. Minussi R. C., Pastore G. M., Duran N., (2002), *Trends Food Sci. Technol.*, 13, 205-216.
72. Larsson S., Cassland P., Jonsson L. J., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1163-1170.
73. Schafer A., Specht M., Hetzheim A., Francke W., Schauer F., (2001), *Tetrahedron*, 57, 7693-7699.
74. Conrad L. S., Sponholtz W. R., Berker O., (2000), US patent: US6152966.
75. Zille A., Munteanu F-D., Guebitz G. M., Cavaco-Paulo A., (2005), *J. Mol. Catal. B*, 33, 23-28.
76. Xu F., Salmon S. I., (2000), US patent: US6129769-A1.
77. Niedermeyer T. H. J., Mikolasch A., Lalk M., (2005), *J. Org. Chem.*, 70, 2002-2008.
78. Anyanwutaku I. O., Petroski R. J., Rosazza J. P., (1994), *Bioorg. Med. Chem.*, 2, 543-551.
79. Hosny M., Rosazza J. P., (2002), *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5539-5545.