

BIOTECHNOLOGICKÝ VÝZNAM LAKASY A JEJÍ CHARAKTERISTIKA

MIROSLAV JOŘENEK a LUDMILA ZAJONCOVÁ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
MiraCRXJorenek@seznam.cz

Došlo 24.4.13, přijato 29.5.13.

Klíčová slova: lakasa, biodegradace, textilní barviva, imobilizace, biotechnologie

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika lakasy
 - 2.1. Organismy produkující lakasu
 - 2.2. Struktura lakasy
 - 2.3. Reakce katalyzované lakasou
3. Využití lakasy v biotechnologických procesech
4. Imobilizace lakasy
5. Závěr

1. Úvod

Lakasa (benzendiol:kyslík oxidoreduktasa, EC 1.10.3.2) je enzym obsahující několik atomů mědi v aktivním místě. Patří do rodiny tzv. „modrých více-měďných oxidas“, mezi něž řadíme také askorbát oxidasu, nitritreduktasu nebo ceruloplasmin¹. Čtyři atomy mědi v aktivním místě katalyzují jednoelektronovou oxidaci molekul substrátu a současně čtyř-elektronovou redukci molekulárního kyslíku na vodu². Lakasa je schopná katalyzovat oxidaci širokého spektra substrátů jako mono-, di- a polyfenolů, aminofenolů, methoxyfenolů a aromatických aminů^{3,4}. V přítomnosti redoxních mediátorů se spektrum substrátů pro lakasu rozšiřuje i na nefenolové sloučeniny^{5,6}. Hlavními zdroji lakasy jsou vyšší rostliny a houby. Je také přítomna u bakterií a hmyzu^{7,8}. Funkcí lakasy v rostlinách je zapojení do biosyntézy ligninu⁹. U mikroorganismů hraje spolu s dalšími extracelulárními enzymy významnou roli v koloběhu uhlíku v důsledku účasti na rozkladu a transformaci ligninu a dalších polyfenolů, které jsou přítomny v tlejícím rostlinném materiálu^{10,11}. Hlavní výhodou lakasy spočívá hlavně v široké substrátové specifitě a dobré dostupnosti. Proto je využívána v řadě biotechnologických aplikací – v papírenském a potravinářském průmyslu nebo v analytické chemii. Použití lakasy tak umožňuje např. zvýšení produktivity, efektivity a kvality potravinářských výrobků, odbarvení průmyslových odpadních vod od tex-

tilních barviv nebo odstraňování ligninu ze dřevních i nedřevních vláken^{2,12,13}.

2. Charakteristika lakasy

Lakasa je oxidasa, která katalyzuje redukci kyslíku na vodu. Tato unikátní schopnost ji odlišuje od ostatních polyfenoloxidas (PPO), jakými jsou katecholoxidasa (EC 1.10.3.1) nebo tyrosinasa (EC 1.14.18.1). Typickým substrátem lakasy je *p*-difenol¹². Pro lakasu jsou charakteristické čtyři atomy mědi, které se liší svou absorpční a viditelnou světlem a signálem elektronové paramagnetické rezonance (EPR). Atom mědi v místě T1 (Typ-1), které je prvním oxidačním místem, absorbuje záření při 600 nm. Modrá barva enzymu je výsledkem absorpce záření kovalentní vazbou mezi atomem mědi místa T1 a cysteinem. Atom mědi v místě T2 (Typ-2) je v absorpčním spektru viditelného záření neviditelný, ale je měřitelný pomocí EPR. T2 spolu s dvěma atomy mědi v místě T3 (Typ-3) vytváří oblast, kde dochází k čtyř-elektronové redukci kyslíku na vodu^{12,14}. T3 místo absorbuje záření při 330 nm. Lakasa je také obecně klasifikována do tří skupin podle redoxního potenciálu T1 místa. Těmito skupinami jsou lakasy s nízkým redoxním potenciálem (0,4–0,5 V), se středním redoxním potenciálem (0,5–0,6 V) a s vysokým redoxním potenciálem¹⁵ (0,7–0,8 V). Lakasy s nízkým a středním redoxním potenciálem se vyskytují převážně u rostlin a bakterií. Lakasy s vysokým redoxním potenciálem pochází především z vláknitých hub¹⁴.

První lakasu objevil už roku 1883 Yoshida. Byla připravena z latexu japonského stromu (*Rhus vernicifera*). Připravený extrakt oxidoval toxický urushiol (3-pentadekadienylkatechol) přítomný v pryskyřici nebo na povrchu rostlin rodu *Rhus*^{16–19}. Roku 1895 byl enzym z japonského stromu purifikován a charakterizován Bertramem a spol. a byl nazván „lakasa“. Tato lakasa měla obsahovat atomy manganu, proto byl označen jako metaloenzym. Surový latex sice obsahoval velké množství manganu, ale pozdější studie ukázaly, že v lakase se vyskytují atomy mědi¹⁸. Roku 1896 byla objevena lakasa ve vláknitých houbách²⁰. První bakteriální lakasa byla objevena roku 1993 u *Azospirillum lipoferum* a po čtyřech letech také ve sporách bakterií *Bacillus sphaericus*¹⁴. Od této doby byla lakasa objevena i v dalších rostlinách, v řadě bakterií a v hmyzu¹⁷.

2.1. Organismy produkující lakasu

Lakasa je přítomna především ve vyšších rostlinách a vláknitých houbách, ale byla nalezena také u několika druhů bakterií²¹. I přes různé místo v taxonomii a širokou substrátovou rozmanitost je molekulární architektura lakasy

společná s dalšími více-měďnými oxidasami⁹. Byly identifikovány čtyři regiony o délce 8–24 reziduí. Tyto regiony, označené L1–L4, obsahují vysoce konzervovanou sekvenci. Regiony L1 a L3 jsou specifické pro lakasy, zatímco L2 a L4 se nachází v široké skupině více-měďných oxidas. Tyto čtyři regiony včetně deseti histidinů a jednoho cysteinu, které slouží jako ligandy pro centrální atom mědi, se vyskytují ve všech více-měďných oxidasach^{14,22}.

Lakasa je přítomna u řady rostlin. Jako první byla nalezena ve vytékající míze japonského stromu *Rhus vernicifera*. Mezi další rostliny obsahující lakasu můžeme zařadit např. mango, broskev, borovice, švestku, tabák, zelí, červenou řepu, brambory, hrušku nebo javor klen²⁴. Nedávno byla lakasa nalezena i v zárodkách semen kukurice. Lakasa se nachází i v xylému u topolu (*Populus trichocarpa*) a žlutého topolu (*Liriodendron tulipifera*)^{23,24}. Funkcí lakasy v rostlinném těle je spolu s peroxidasou především polymerace ligninu (dřevnatění). Lakasa zde katalyzuje homomolekulární dimerizaci monolignolů, což má za následek vznik homomolekulárních dimerů spojených vazbou mezi uhlíkem a kyslíkem (C-O) nebo uhlíkem a uhlíkem (C-C). Tyto dimery pak mohou být spojeny navzájem a vytvářet oligomery a polymery. Mezi další funkce patří regenerace poškozeného pletiva nebo oxidace železa^{7,9} (Fe^{2+} na Fe^{3+}). Při poranění dochází u stromu *Rhus vernicifera* za přítomnosti lakasy k oxidaci fenolů vyskytujících se ve vytékající míze a jejich následné polymerizaci, kterou se vytváří síťová struktura¹⁸. Všechny známé rostlinné lakasy jsou extracelulární glykoproteiny vylučované do apoplastu⁷. Přestože existuje mnoho rostlin obsahujících lakasu, není snadné ji purifikovat, protože s lakasou je v rostlinách přítomna i řada dalších oxidačních enzymů¹⁸.

Lakasa je široce rozšířena ve vláknitých houbách. Mezi houby, které nejvíce produkují lakasu, patří především Askomycety, Deuteromycety a Basidiomycety^{9,23}. Lakasu obsahující vláknité houby (označované též jako dřevo-degradující vláknité houby) zahrnují tyto druhy vláknitých hub: *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Pleurotus ostreatus*, *Cerrena maxima*, *Phlebia radiata*, *Theiophora terrestris*, *Lentinus tigrinus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Neurospora crassa* a další. Dalšími příklady mohou být saprofytická askomyceta v kompostech jako *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium* a *Chaetomium thermophile* nebo houby tvořící ektomykorhizu *Cantharellus cibarius*, *Lactarius piperatus* a *Russula delica*^{9,24}. Vedle degradace biopolymerů (rozklad dřevní hmoty) se lakasa u vláknitých hub účastní i pigmentace způsobené environmentálním stresem, formování plodnice, morfogeneze, detoxifikace složek rostlinných obranných systémů (fytoalexinů a tříslovin), sporulace a patogeneze^{3,7,9,25}. Ve vláknitých houbách je lakasa extracelulární enzym⁹. Při kultivaci může být produkce lakasy zvýšena přidáním různých aromatických sloučenin, kovových iontů nebo některých xenobiotik s nízkou molekulární hmotností do média^{15,26}.

Mezi další organismy, u kterých lze nalézt lakasu, patří bakterie. První bakteriální lakasa byla nalezena

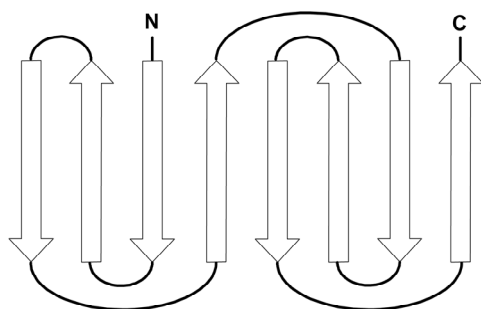
u Gram-negativní půdní bakterie^{23,25} *Azospirillum lipoferum* roku 1993. Tato bakterie se nachází v půdě v rhyzosféře trav a obilovin⁹. Dalšími zástupci z bakterií jsou *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces griseus*, *Marinomonas mediterranea* a *Yersinia pestis*^{9,12,23}. Bakteriální lakasy jsou odlišné od lakas přítomných u Askomycet a Basidiomycet. Bakteriální lakasy jsou velmi aktivní a mnohem více stabilní při vysokých teplotách, při vysokém pH i při vysoké koncentraci chloridových iontů a iontů mědi⁹. Téměř všechny bakteriální lakasy jsou intracelulární nebo vázané na výtrusy^{14,23,25}. V bakteriích a hlavně v nejvíce studovaném *Bacillus subtilis* se lakasa účastní produkce hnědého pigmentu na povrchu spor. Může tak pomáhat při ochraně spor proti UV záření a peroxidu vodíku^{7,9}.

Lakasa byla zjištěna i u různých druhů hmyzu. Příkladem těchto druhů může být *Bombyx*, *Calliphora*, *Diploptera*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Oryctes*, *Papilio*, *Phormia*, *Rhodnius*, *Sarcophaga*, *Schistocerca* nebo *Tenebrio*²³. U hmyzu se lakasa nachází v kutikule, kde oxiduje katecholy na jejich odpovídající chinony, které pak katalyzují zesíťování proteinů. Tímto procesem dochází ke sklerotizaci (ukládání minerálních látek) kutikuly²⁴. V Holometabolech (hmyz s proměnou dokonalou) je lakasa hlavním enzymem, který se účastní tvrdnutí kutikuly. Lakasa je exprimována i ve střevech hmyzu, kde zřejmě slouží k oxidaci toxických látek požitých hmyzem²⁴.

2.2. Struktura lakasy

Lakasy jsou převážně monomerní, dimerní nebo tetramerní glykoproteiny. Monomer obsahuje čtyři ionty mědi. Sacharidy v enzymu jsou převážně tvořeny mannosou, *N*-acetylglukosaminem a galaktosou. Glykosylace hraje důležitou roli při vazbě mědi, sekreci, tepelné stabilitě a citlivosti k proteolytické degradaci^{5,17,24}. Přečištěné lakasy mají charakteristický zelenomodrý vzhled²³, který je dán absorpcí světla atomem mědi typu 1 při 600 nm a atomem mědi typu 3 při 320 nm. Na základě struktury vznikly lakasy pravděpodobně z malých modrých proteinů obsahujících měď (azurin a plastocyanin) a jejich struktura je podobná s ceruloplasminem a askorbát oxidasou^{18,21}. Všechny tři níže popsané druhy lakas jsou si svou strukturou velmi podobné. Nejvýraznější podobnosti se nachází v *N*- a *C*-terminálních částech enzymu a v oblasti aktivního místa, kde jsou vázány atomy mědi⁹.

Většina lakas z vláknitých hub je extracelulární a monomerní^{22,24} o molekulové hmotnosti 60–90 kDa. Molekula enzymu obsahuje 10–25 % sacharidů⁹. Při různých kultivačních podmínkách produkují vláknité houby více izoform (inducibilní a konstitutivní) lakasy⁵. Lakasa je tvořena 500–700 aminokyselinami^{17,18}. Lakasy o nízké molekulové hmotnosti byly nalezeny u *Volvariella volvacea* (58 kDa) a u *Marasmius quercophilus*¹² (63 kDa). Struktura těchto lakas je tvořena třemi postupně uspořádanými kupredoxinovými doménami. Každá z nich má strukturu β -listu ve tvaru Řeckého klíče⁸ (obr. 1).



Obr. 1. Struktura β -barelu, skládajícího se ze dvou motivů ve tvaru Řeckého klíče²⁷

Atom mědi T1 je umístěn v doméně 3, zatímco klastř atomů mědi T2 a T3 leží mezi doménou 1 a 3. Obě domény tak svými zbytky koordinují atomy mědi v enzymu. Struktura je stabilizována pomocí dvou disulfidových můstků⁸ mezi doménou 1 a 3 a doménou 1 a 2.

Bakteriální lakasy mohou být monomerní (*Bacillus subtilis*), homotrimerní (*Streptomyces griseus*) nebo multimerní proteiny (*Azospirillum lipoferum*). Molekulová hmotnost bakteriálních lakas je větší než u vláknitých hub a pohybuje se od 50 kDa až k 180 kDa. Většina bakteriálních lakas je intracelulární a není glykosylována^{7,14}. Struktura byla vyřešena zejména u tří bakteriálních lakas. Jedná se o lakasy CueO (copper efflux oxidase) z *Escherichia coli*, CotA (endospore coat protein) z *Bacillus subtilis* a SLAC (small laccase) z *Streptomyces coelicolor*. Lakasa SLAC se od zbylých dvou liší tím, že neobsahuje doménu 3. Klastř atomů mědi je umístěn mezi doménou 1 a 2 a stabilitu tak zajišťuje symetrické uspořádání těchto dvou domén¹⁴.

Rostlinné lakasy jsou monomerní a ze všech tří druhů lakas nejvíce glykosylované (22–45 %). Mají také vyšší molekulovou hmotnost než lakasy u vláknitých hub^{7,9}.

Struktura aktivního místa je i přes nízkou sekvenční homologii bakteriálních lakas a lakas z vláknitých hub velmi podobná. Aktivní místo obsahuje čtyři specificky umístěné atomy mědi¹⁴ (obr. 2).

Atomy mědi jsou rozděleny do tří typů (T1–T3) podle signálu elektronové paramagnetické rezonance (EPR) a UV-VIS spektra. T1 atom mědi poskytuje enzymu modrou barvu (absorbance při 610 nm) a je možné ho detegovat i pomocí EPR. T2 atom mědi není barevný, ale je zachytitelný pomocí EPR. T3 obsahuje dva atomy mědi, které mají slabou absorbanci v blízké UV oblasti (330 nm), ale nejsou detegovatelné pomocí EPR^{17,24}. T1 je koordinován dvěma histidiny, jedním methioninem a jedním cysteinem a zaujímá tak pokrivenou trigonální strukturu^{9,14}. Jednojaderný T2 a dvoujaderný T3 vytváří dohromady trojjaderný klastř. T2 je koordinován dvěma histidiny a molekulou vody a T3 šesti histidiny. Dva atomy mědi v T3 jsou antiferomagneticky spojeny přes přemostění hydroxidovým iontem^{14,21,24}. Přítomnost methioninu, fenylylalaninu

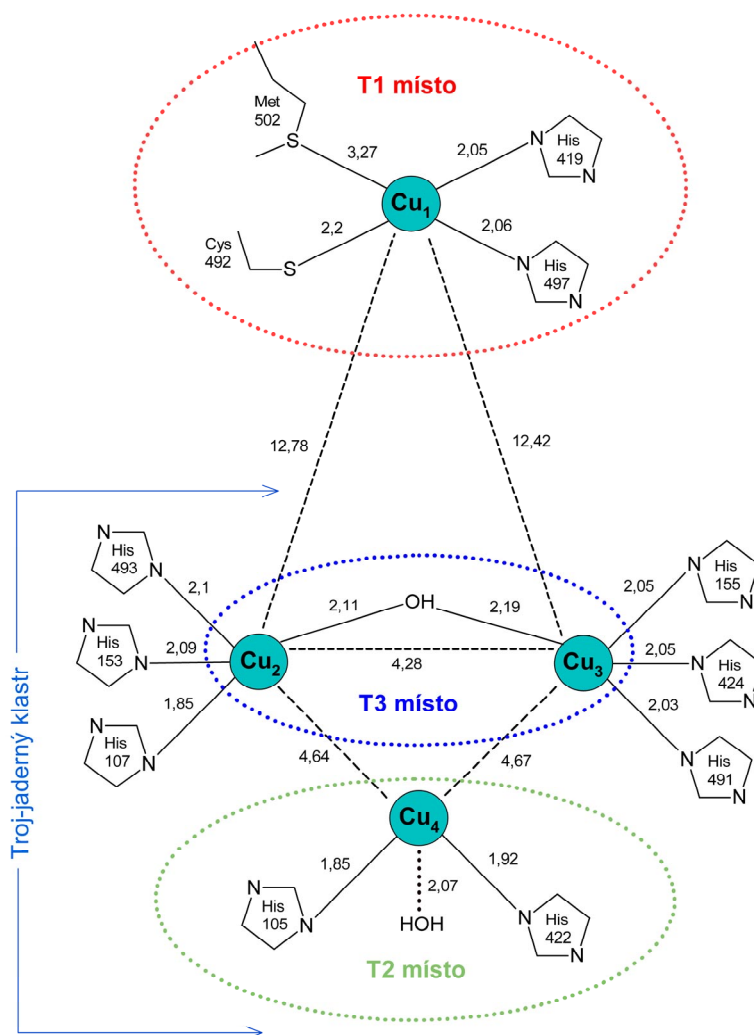
nebo leucinu pro koordinaci atomu mědi T1 určuje redoxní potenciál lakasy. Mutace methioninu za leucin vede ke zvýšení redoxního potenciálu¹⁸ lakasy o 100 mV. Nízký redoxní potenciál mají zejména lakasy z bakterií a rostlin. Oproti nim mají lakasy z vláknitých hub (zejména Basidiomycety) vysoký redoxní potenciál⁹.

2.3. Reakce katalyzované lakasou

Reakce katalyzované lakasou lze rozdělit do tří typů. Prvním typem je přímá oxidace jednoduchých derivátů fenolu. Do druhého typu patří oxidace fenolových a nefenolových substrátů zprostředkované přítomností mediátoru a třetím typem je spojování reaktivních radikálů tvořených lakasou⁷.

Lakasy mají nízkou substrátovou specifitu. Mezi jejich substráty patří široká škála fenolových i nefenolových sloučenin¹². Běžnými substráty lakas jsou fenoly⁷. Organické substráty lakasy lze rozdělit do tří skupin: *ortho*- (např. guajakol, *o*-fenylendiamin, pyrokatechol, dihydroxyfenylalanin, pyrogallol nebo kyselina kávová, gallová a protokatechová), *meta*- (např. *m*-fenylendiamin, orcinol, resorcinol a floriglucin) a *para*- (např. *p*-fenylendiamin, *p*-kresol nebo hydrochinon) substituované sloučeniny s volným elektronovým párem. Pro většinu lakas jsou *ortho*-substituované sloučeniny nejlepšími substráty. Jako specifický substrát pro lakasu je obvykle označován syringaldazin (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehydazín)^{9,28}. Velmi používaný substrát je také 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) známý pod zkratkou ABTS (cit.¹⁴). Syringaldazin a ABTS jsou pro lakasu lepšími substráty než např. přirozeně se vyskytující 2,6-dimethoxyfenol¹⁸. Lakasa je schopná oxidovat také některé anorganické ionty¹⁴ jako $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$; $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, $[\text{Os}(\text{CN})_6]^{4-}$ a $[\text{W}(\text{CN})_8]^{4-}$. Mezi substráty lakasy můžeme zařadit také škodlivé a nežádoucí organické sloučeniny, jakými jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, chlorfenoly, polychlorované bifenoly a různá azo, heterocyklická a polymerní barviva²⁹. Lakasa dobře oxiduje antrachinonová barviva, ale azobarviva a indigoidní barviva jsou špatnými substráty³⁰.

Pro rozšíření počtu substrátů, které je lakasa schopna katalyzovat, lze využít chemické látky o nízké molekulové hmotnosti (mediátory), které zprostředkovávají přenos elektronů mezi lakasou a substrátem¹². Pomocí mediátorů lze oxidovat látky s vyšším redoxním potenciálem, než které je schopna oxidovat lakasa³. Reakcí s lakasou dochází k jednoelektronové oxidaci mediátoru. Mediátor tak musí poskytovat stabilní oxidovaný produkt, který je schopen šířit se v roztoku a interagovat se substrátem. Takováto oxidace může probíhat i mimo enzym a substrát tak může mít jinou strukturu než aktivní místo enzymu¹⁸. Mezi mediátory můžeme zařadit ABTS, syringaldazin, acetosyringon, vanilin a jeho deriváty, *p*-kumarovou kyselinu nebo *N*-hydroxy sloučeniny jako *N*-hydroxybenzotriazol^{12,21}. Při kontaktu mediátoru se substrátem může docházet ke dvěma reakcím. Při první reakci může mediátor vyjmout elektron, což vede ke vzniku kation-

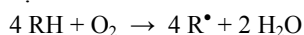


Obr. 2. Schematické zobrazení aktivního místa lakasy CotA z *Bacillus subtilis* včetně meziatomových vzdáleností mezi všemi ligandy^{9,14}

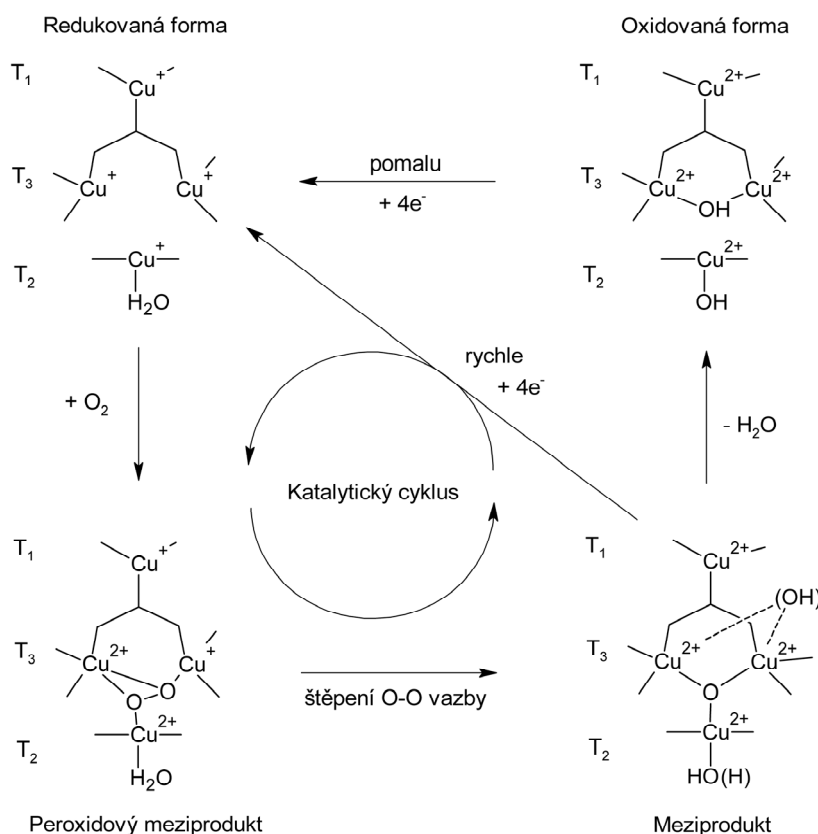
radikálového meziprojektu, u kterého může dojít k přesmyku nebo ke štěpení. Příkladem takového mediátoru je např. ABTS. U druhého typu reakce mediátor odebere vodíkový atom a vzniká radikál. Tento mechanismus je typický pro *N*-hydroxy mediátory¹⁸. Nevýhodou použití mediátoru může být jeho vysoká cena a potenciální vznik toxických produktů. Šetnější k životnímu prostředí může být použití přírodních substituovaných fenolů jako syringaldehyd, acetosyringon nebo 3-hydroxyanthranilová kyselina. Tyto přírodní mediátory se účastní oxidace ligninu, protože tato reakce probíhá spíše přes reakci s mediátory, než samotnou lakasou^{14,31}.

Mechanismus oxidace substrátu za katalýzy lakasou se skládá z několika kroků. Nejprve dojde k vazbě redukováného substrátu na atom mědi T1 a přenesení elektronu ze

substrátu na tento atom [T1 – Cu(II) → T1 – Cu(I)]. Tímto krokem se vytváří ze substrátu radikál. Následně dojde k internímu přenosu elektronu z T1 na troj-jaderný klastř T2/T3. Na T2/T3 klastř se naváže molekulární kyslík a dojde k přenosu elektronů z T2 a T3 atomů mědi na kyslík a k jeho redukcí přes meziprojekt (peroxid vodíku) na vodu. Během každého cyklu tak lakasa spojuje čtyřelektronovou oxidací substrátu s čtyřelektronovou redukcí a štěpením vazby mezi kyslíky za použití čtyř atomů mědi rozmístěných na třech místech v aktivním místě enzymu. Celkovou reakci (obr. 3) lze shrnout do následující rovnice^{7,9,12}:



Molekula substrátu může poskytnout i více jak jeden elektron²⁵. Radikál substrátu může dále podstoupit další



Obr. 3. Katalytický cyklus enzymové reakce lakasy zahrnující čtyř-elektronovou redukcí molekuly kyslíku na vodu v aktivním místě enzymu¹²

oxidaci, kdy vzniká chinon, nebo neenzymovou reakci jako hydrataci, disproportionaci a polymeraci²⁴.

Pro každou enzymovou reakci je důležité pH prostředí, ve kterém reakce probíhá. Lakasy z vláknitých hub mají kyselý pH optimum (3–6). Bakteriální lakasy jsou stabilní při vyšším pH (6,0–8,5). Substrát, který je přímo oxidován lakasou, musí mít ionizační potenciál nižší nebo jen nepatrně vyšší, než je standardní redukční potenciál atomu mědi¹⁴ T1. Redoxní potenciál fenolových sloučenin klesá se zvyšujícím se pH, čímž se zvyšuje redoxní potenciál mezi substrátem a atomem mědi T1. Při vyšších hodnotách pH se ale hydroxidový ion váže do T2/T3 klastru a přerušuje vnitřní přenos elektronů^{12,18}. Bakteriální lakasy mají proti lakasám z vláknitých hub obvykle nízký redukční potenciál na T1. Je to obvykle méně než 0,5 V. U vláknitých hub se redukční potenciál na T1 pohybuje v rozsahu 0,5–0,8 V. Lakasy z vláknitých hub jsou schopny pracovat při teplotě¹⁴ 30–55 °C. Bakteriální lakasy jsou více tepelně stabilní^{9,12} (až do 70 °C).

Lakasy jsou inhibovány různými látkami. Halogenidy, azidy, kyanidy, sulfidy, uhličitany a těžké kovy snižují katalytickou účinnost lakasy¹⁶. Ionty F⁻, CN⁻, N³⁻ nebo O₂²⁻ se váží do T2 místa a v některých případech i do

můstku mezi T2 a T3 centrem. Tyto inhibitory tak přeruší vnitřní přenos elektronů a tím i celou reakci. Mezi další inhibitory lakas patří kovové ionty (Hg²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Sn²⁺, Ba²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Mn²⁺ a Zn²⁺). T1 atom mědi tak může být nahrazen redoxně neaktivním Hg²⁺ iontem a dojde k nevratné inaktivaci enzymu^{9,18,25}. *N*-Hydroxyglycin a mastné kyseliny mohou blokovat přístup k aktivnímu místu¹⁶. Chelatační činidla jako EDTA ovlivňují aktivitu lakasy chelatací atomů mědi⁹. Lakasu inhibuje také vysoká koncentrace organického rozpouštědla²⁵ (> 30 %).

Pro zlepšení a změnu vlastností lakas se používá mutagenese určitého místa enzymu. Jedná se především o aktivní nebo i glykosylační místo. Cílená mutagenese např. glutamové kyseliny za threonin ve vazebném místě pro substrát vedla k výraznému poklesu katalytické oxidace fenolových sloučenin. Katalytická oxidace nafenolových sloučenin (ABTS) však zůstala stejná¹⁶. Pro zvýšení produkce enzymu lze také gen kódující lakasu přenést do jiného organismu, který se snadněji množí v laboratorních podmínkách nebo za regulační místo v genomu, kde by byl více exprimován. Příkladem může být lakasa z *Pleurotus ostreatus*, která byla exprimována v *Sacharomyces cerevisiae*. Kvasinky produkovaly variantu lakasy, která měla

větší katalytickou aktivitu a stabilitu¹⁶. Jednotlivými technikami používanými v molekulární biologii i jejich spojením lze snížit náklady za používání enzymu. Ať už získáváme větší množství enzymu nebo jeho větší účinnost.

3. Využití lakasy v biotechnologických procesech

Lakasa je pro svou širokou substrátovou specifitu a oxidační vlastnosti používána v mnoha průmyslových aplikacích. Uplatňuje se v potravinářském a papírenském průmyslu, v syntetické chemii, bioremediaci a biologickém rozkladu fenolových látek znečišťujících životní prostředí nebo i v analytických aplikacích^{12,24}.

V potravinářském průmyslu slouží lakasa k odstranění nežádoucích fenolových sloučenin při pečení, zpracování šťáv nebo při zrání vína. V ovocných šťávách, pivu a vínu mohou fenolové sloučeniny způsobovat hnědnutí nebo tvorbu zákalu. Lakasa zlepšuje např. smyslové vlastnosti produktu. V pivovarnictví lakasa katalyzuje odstranění přebytečného kyslíku a oxidaci proanthokyanidinů a tím přispívá k vyšší stabilitě a trvanlivosti piva. Stejnou funkci má lakasa i při výrobě ovocných šťáv a vín. V ovocných šťávách se přirozeně vyskytují fenolové sloučeniny a jejich oxidační produkty, které jim dávají charakteristickou chuť a barvu. Tato barva a chuť tak může být za přítomnosti lakasy změněna oxidací a polymerací těchto látek. Při přidání lakasy do těsta se u pekařských výrobků zvětšil jejich objem, zlepšila se měkkost pečiva a došlo ke snížení lepivosti těsta^{17,24}.

V papírenském průmyslu slouží lakasa k částečné degradaci ligninu při výrobě papíru. K degradaci ligninu se běžně používá alkalická extrakce, chlor, kyselina chlorná, ClO₂ a kyslíkaté chemické oxidanty jako peroxid vodíku, kyslík nebo ozon. Během alkalické extrakce je díky vysoké rozpustnosti v horkém alkalickém roztoku většina ligninu vázaného na celulosová vlákna odstraněna. Při bělení chlorem se mohou vytvářet toxické a vysoce perzistentní chlorované organické sloučeniny (např. dioxiny). Oxidace fenolových hydroxylových skupin ligninu lakasou vede ke vzniku fenoxylradikálů, které se mohou spontánně přeskupit a vést k rozštěpení alkylových postranních řetězců polymeru^{9,12,24}. Použití lakasy v tomto procesu je vzhledem k životnímu prostředí šetrnější.

Lakasa je používána také k přípravě polymerů. Oxidací vhodných substrátů vznikají reaktivní radikály, které mohou podstoupit mnoho neenzymových reakcí. Těmito neenzymovými reakcemi se z výchozích látek za vzniku kovalentních vazeb C-C, C-O, a C-N mohou tvořit dimery, oligomery a polymery. V přítomnosti mediátoru se štěpením kovalentních vazeb mohou tvořit i monomery. Syntéza těchto nových sloučenin nebo jejich modifikace pomocí lakasy nabízí možnosti převážně pro farmaceutický a kosmetický průmysl^{17,32}. Lakasu je možné využít i pro výrobu aldehydů oxidací alkoholů. Nahrazuje běžně používaná oxidační činidla jako chromany a jodistany a šetří tak životní prostředí. Aldehydy s vyšší molekulovou hmotností

mají často příjemnou vůni květů. Mohou být použity jako přísady pro parfémy nebo jako meziproducty pro výrobu syntetických pryskyřic, barviv, desinfekčních prostředků a konzervačních látek¹⁸.

Lakasa reaguje s mnoha látkami a je tak výhodná v bioremediaci životního prostředí. Oxiduje látky, které mohou vytvářet nerozpustné složité struktury. Účastní se degradace fenolových sloučenin přítomných v odpadech z mnoha průmyslových procesů jako zpracování ropy, výroba organických chemikálií, lihovary nebo produkce olivového oleje^{9,24,28}. Je schopná degradovat polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), polychlorované bifenyly (PCB), benzen nebo toluen^{9,17,24,25}.

Lakasa také reaguje s různými druhy textilních barviv a degraduje je. Může také docházet k spojovacím reakcím a tvorbě sraženin barviv, které jdou lépe odstranit³². Převažná většina textilních barviv je složena ze substituovaných aromatických sloučenin a heterocyklů. Barviva jsou na základě struktury chromoforu klasifikována do několika skupin. Největší a nejrozšířenější skupinu zřejmě tvoří azobarviva. Dalšími skupinami mohou být antrachinonová, indigo, trifenylmethanová, ftalokyaninová nebo polyaromatická barviva^{6,7,33}. Výhodou těchto barviv je odolnost vůči vyblednutí působením světla, vody nebo dalších chemických látek²⁴. Nevýhoda používání těchto barviv spočívá v možné karcinogenitě a mutagenitě¹². Odpadní vody z textilního průmyslu jsou zbarvené těmito látkami. Tyto barviva jsou v běžných biologických čistírnách odpadních vod mikrobiální populací těžko rozložitelná. Pro mikroorganismy mohou být i toxická a vést k jejich usmrcení^{6,29}. Pro odstranění látek z odpadních vod existují fyzikálně-chemické metody jako adsorpce, koagulace, oxidace, filtrace nebo elektrochemické úpravy. Pro odstranění barviv se běžně užívá adsorpce a koagulace. Adsorpce a koagulace barviv je sice úspěšná, ale vytváří se obrovské množství kalu, kdy se látky pouze přenáší z odpadních vod do tuhého odpadu^{29,31}. Toxicita enzymových produktů u některých barviv zůstává stejná nebo dochází ke ztrátě toxicity²⁴.

Lakasa může být součástí biorekogniční vrstvy při konstrukci biosenzorů, které mohou být využity k detekci fenolových sloučenin, kyslíku, azidu, kyseliny askorbové, morfinu, kodeinu a různých flavonoidů^{17,24,29}.

4. Imobilizace lakasy

Široké používání enzymů v průmyslových aplikacích je omezeno z několika důvodů. Obecně mají enzymy nízkou stabilitu. Nízká stabilita lakasy při jejím použití v odpadních vodách např. z textilního průmyslu nikdy nepřispěje k jejímu širokému využívání. Dalším dobře známým důvodem jsou ceny enzymů. Při použití velkých množství relativně čistého enzymu s dobrou specifickou aktivitou mohou být cenové náklady příliš vysoké^{34,35}. Tyto problémy mohou být vyřešeny imobilizací enzymu na vhodný nosič. Pro tento účel byla vytvořena řada nosičů různých geometrických tvarů. Nosiče mohou být přírodní (chitin, chitosan, agarosa, deriváty celulosy) nebo syntetické

ké (nylon, polyvinylalkohol, polyglycidylmetakrylát, polysiloxan)³⁴. Jmenované nosiče mohou být použity samostatně nebo jako krycí nebo obalový materiál pro další nosiče, jakými jsou např. dutá mikroporézní polypropylenová vlákna, membrány nebo magnetické či nemagnetické mikro- a nanočástice³⁶. Imobilizací se mohou zlepšit nebo naopak zhoršit vlastnosti enzymu. Většinou dochází k zlepšení stability enzymu vzhledem k teplotě, pH prostředí nebo organickým rozpouštědlům. V důsledku imobilizace enzymu může dojít ke snížení aktivity imobilizovaného enzymu proti volnému. Hlavní výhodou imobilizace enzymů je jeho opětovné použití a jeho snadná separace z reakční směsi.

Lakasa byla imobilizována různými metodami na řadu nosičů. Příkladem imobilizace je např. lakasa imobilizovaná na silikátových nanočásticích, kdy však lakasa ztratila 60 % své aktivity³⁷, nebo na magnetické formě makroporézních částic celulosy, kdy při použití orientované imobilizace přes glykosylované řetězce enzymu byla naměřena aktivita enzymu vyšší než u neorientované imobilizace³⁵. Pro odbarvování barviv byla lakasa imobilizována na silikagelu modifikovaném imidazolem nebo na hliníkových částicích pokrytých silikátem³⁸. Při odbarvování barviv dochází ke ztrátě zbarvení nejen enzymovou reakcí, ale často i adsorpcí barviva na nosič. Při použití skleněných částic s kontrolovanou porozitou byla však převážná většina antrachinonového barviva degradována enzymovou reakcí lakasy³⁸. Lakasa byla zesíťována glutaraldehydem a pokrytím alternativně nabitým elektrolytem imobilizována na hliníkových částicích zároveň i s dalším enzymem – křenovou peroxidasou. Tyto enzymy byly proti volným formám stabilnější a byly úspěšně použity při degradaci ligninu³⁹. Lakasa je také používána v analytických aplikacích jako biosenzor převážně pro detekci fenolů. Pro tento účel byla imobilizována např. na polyvinylalkoholu, komplexech osmia, nafion/sol-gel silikátu, chitosanu, silikagelu nebo na Langmuir-Blodgett (LB) filmu^{40,41}. Lakasa imobilizovaná na LB filmu měla 10 % aktivitu nativního enzymu a při přimíchání amfifilního *N*-alkyl-bis(thiofen)arylenu do LB filmu došlo k zvýšení citlivosti biosenzoru⁴¹. Imobilizovanou lakasu lze také použít jako elektrodu v elektrochemickém článku. Při zkonstruování anody tvořené imobilizovanou glukosaoxidasou a katody tvořené imobilizovanou lakasou a použitím 1,1'-dikarboxyferrocenu jako mediátoru přenosu elektronů mezi oběma elektrodami, lze použitím šťávy z ovoce (pomaranč, grep, banán) vyrábět malé napětí⁴² kolem 200 mV. S rozšířením nanotechnologií došlo k imobilizaci lakasy také na různé uhlíkové nanomateriály, jakými jsou např. nanotrubičky nebo oxidy grafenu⁴³, částice zlata⁴⁴ nebo chitosanem pokryté magnetické nanočástice železa⁴⁵.

5. Závěr

Pro oxidaci látek se využívají různá oxidační činidla. Tato činidla představují velkou zátěž pro životní prostředí.

Použití enzymové reakce místo chemické reakce umožní tuto zátěž snížit. Lakasa je pro svou širokou substrátovou specifitu zajímavou alternativou oxidačních činidel jako jodistan nebo chroman. Přesto, že je lakasa už často používána v nejrůznějších biotechnologických aplikacích, náklady při používání enzymu jsou stále vyšší než používání chemických sloučenin. Při některých průmyslových aplikacích je nežádoucí používat chemické oxidanty a tak se nabízí možnost využití lakasy. Snížení nákladů na provoz enzymu tak může být dosaženo imobilizací enzymu nebo zefektivněním zisku enzymu z organismů, které tento enzym produkuje.

Tato práce byla podpořena vnitřním grantem Univerzity Palackého PrF_2013_037.

LITERATURA

1. Wong D. W. S.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157, 174 (2009).
2. Minussi R. C., Pastore G. M., Durán N.: *Trends Food Sci. Technol.* 13, 205 (2002).
3. Monti D., Ottolina G., Carrea G., Riva S.: *Chem. Rev.* 111, 4111 (2011).
4. Nyanhongo G. S., Prasetyo E. N., Acero E. H., Guebitz G. M.: *Chem. Eng. Technol.* 35, 1359 (2012).
5. Kunamneni A., Camarero S., García-Burgos C., Plou F. J., Ballesteros A., Alcalde M.: *Microb. Cell Fact.* 7, 32 (2008).
6. Teixeira R. S. S., Pereira P. M., Ferreira-Leitão V. S.: *Enzyme Res.* 2010, 1 (2010).
7. Polak J., Jarosz-Wilkolazka A.: *Process Biochem.* 47, 1295 (2012).
8. Piscitelli A., Del Vecchio C., Faraco V., Giardina P., Macellaro G., Miele A., Pezzella C., Sannia G.: *C. R. Biol.* 334, 789 (2011).
9. Dwivedi U. N., Singh P., Pandey V. P., Kumar A.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 68, 117 (2011).
10. Eichlerová I., Šnajdr J., Baldrian P.: *Chemosphere* 88, 1154 (2012).
11. Torres C. E., Negro C., Fuente E., Blanco A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 327 (2012).
12. Singh G., Bhalla A., Kaur P., Capalash N., Sharma P.: *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10, 309 (2011).
13. Hildén K., Hakala T. K., Lundell T.: *Biotechnol. Lett.* 31, 1117 (2009).
14. Santhanam N., Vivanco J. M., Decker S. R., Reardon K. F.: *Trends Biotechnol.* 29, 480 (2011).
15. Lomascolo A., Uzan-Boukhris E., Herpoël-Gimbert I., Sigoirot J. C., Lesage-Meessen L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 1129 (2011).
16. Rodgers C. J., Blanford C. F., Giddens S. R., Skamnioti P., Armstrong F. A., Gurr S. J.: *Trends Biotechnol.* 28, 63 (2009).
17. Mendonça Maciel M. J., Castro e Silva A., Camarão Telles Ribeiro H.: *Electron. J. Biotechnol.* 13, 1 (2010).
18. Matijošytė I.: *Dissertation*. Delft Univerzity of Tech-

- nology, Delft, Nizozemsko, 2008.
19. Cañas A. I., Camarero S.: *Biotechnol. Adv.* 28, 694 (2010).
 20. Witayakran S., Ragauskas A. J.: *Adv. Synth. Catal.* 351, 1187 (2009).
 21. Durán N., Rosa M. A., D'Annibale A., Gianfreda L.: *Enzyme Microb. Technol.* 31, 907 (2002).
 22. Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G.: *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 369 (2010).
 23. Arora D. S., Sharma R. K.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 1760 (2010).
 24. Singh S., Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A.: *Enzyme Res.* 2011, 1 (2011).
 25. Majeau J. A., Brar S. K., Tyagi R. D.: *Bioresour. Technol.* 101, 2331 (2010).
 26. Han M. J., Choi H. T., Song H. G.: *J. Microbiol.* 43, 555 (2005).
 27. <http://what-when-how.com/molecular-biology/antiparallel-beta-barrel-motifs-molecular-biology/>, staženo 30. listopadu 2012.
 28. Minussi R. C., Miranda M. A., Silva J. A., Ferreira C. V., Aoyama H., Marangoni S., Rotilio D., Pastore G. M., Durán N.: *Afr. J. Biotechnol.* 6, 1248 (2007).
 29. Nyanhongo G. S., Gomes J., Guebitz G. M., Zvauya R., Read J., Steiner W.: *Water Res.* 36, 1449 (2002).
 30. Wong Y., Yu J.: *Water Res.* 33, 3512 (1999).
 31. Gomaa O. M.: *Int. J. Agric. Biol.* 7, 25 (2005).
 32. Kudanga T., Nyanhongo G. S., Guebitz G. M., Burton S.: *Enzyme Microb. Technol.* 48, 195 (2011).
 33. Eichlerová I., Homolka L., Nerud F.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 759 (2006).
 34. Bayramoglu G., Yilmaz M., Arica M. Y.: *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33, 439 (2010).
 35. Rotková J., Šuláková R., Korecká L., Zdražilová P., Jandová M., Lenfeld J., Horák D., Bilková Z.: *J. Magn. Magn. Mater.* 321, 1335 (2009).
 36. Hua F., Jun H., Liyun D., Mingtian L., Zhao C.: *J. Wuhan Univ. Technol., Mater. Sci. Ed.* 24, 42 (2009).
 37. Demarche P., Junghanns C., Nair R. R., Agathos S. N.: *Biotechnol. Adv.* 30, 933 (2012).
 38. Champagne P.-P., Ramsay J. A.: *Bioresour. Technol.* 101, 2230 (2010).
 39. Gasser C. A., Hommes G., Schäffer A., Corvini P. F.-X.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1115 (2012).
 40. Karim F., Fakhrudin A. N. M.: *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 11, 261 (2012).
 41. Sołoducho J., Cabaj J., Świst A.: *Sensors* 9, 7733 (2009).
 42. Yu E. H., Scott K.: *Energies* 3, 23 (2010).
 43. Park J. H., Xue H., Jung J. S., Ryu K.: *Korean J. Chem. Eng.* 29, 1409 (2012).
 44. Qiu H., Xu C., Huang X., Ding Y., Qu Y., Gao P.: *J. Phys. Chem. C* 113, 2521 (2009).
 45. Kalkan N. A., Aksoy S., Aksoy E. A., Hasirci N.: *J. Appl. Polym. Sci.* 123, 707 (2012).

M. Jořenek and L. Zajoncová (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*): **Biotechnological Importance of Laccase and Its Characteristics**

Due to the presence of four Cu atoms in the active site of laccase (an oxidoreductase) it catalyzes oxidation of a wide range of substrates and also reduces oxygen to water. The laccase substrates include, e.g., phenols, ABTS [2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazole-6-sulfonic acid)] and syringaldazine. Laccase is used in analytical chemistry, in paper and food industry due to its substrate specificity in oxidation. Laccase is able to decolorize wastewaters from textile industry. The review summarizes laccase characteristics and its biotechnological applications.