



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Ana Chaleckaja

**PQQ PRIKLAUSOMOS ALKOHOLIO DEHIDROGENAZĖS
KATALIZUOJAMŲ ALKOHOLIŲ VIRSMŲ, NAUDOJANT ĮVAIRIUS
MEDIATORIUS, TYRIMAI**

**INVESTIGATIONS OF PQQ DEPENDENT ALCOHOL DEHYDROGENASE
CATALYSED ALCOHOLS CONVERSION REACTIONS BY USING VARIOUS
MEDIATORS**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2012

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

(Vardas, pavardė)

(Data)

Ana Chaleckaja

**PQQ PRIKLAUSOMOS ALKOHOLIO DEHIDROGENAZĖS
KATALIZUOJAMŲ ALKOHOLIŲ VIRSMŲ, NAUDOJANT ĮVAIRIUS
MEDIATORIUS, TYRIMAI**

**INVESTIGATIONS OF PQQ DEPENDENT ALCOHOL DEHYDROGENASE
CATALYSED ALCOHOLS CONVERSION REACTIONS BY USING VARIOUS
MEDIATORS**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Bioinžinerijos specializacija

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas

dr. Regina Vidžiūnaitė
(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Lietuvių kalbos konsultantas doc. dr. Angelė Kaulakienė
(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2012

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos specializacija

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

(Vardas, pavardė)

(Data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.

Vilnius

Studentei

Anai Chaleckajai

(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema: **PQQ PRIKLAUSOMOS ALKOHOLIO DEHIDROGENAZĖS
KATALIZUOJAMŲ ALKOHOLIŲ VIRSMŲ, NAUDOJANT ĮVAIRIUS MEDIATORIUS,
TYRIMAI**

patvirtinta 2011 m. spalio mėn. 26 d. dekanu potvarkiu Nr. 380 fm
Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2012 m. gegužės mėn. 30 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

1. Naudojant spektrofotometrinį metodą ištirti PQQ ADH katalizuojamos reakcijos pradinio greičio priklausomybes nuo substratų koncentracijų
2. Naudojant spektrofotometrinį metodą ištirti PQQ ADH katalizuojamos reakcijos pradinio greičio priklausomybes nuo mediatorių koncentracijų
3. Nustatyti tariamuosius kinetinius parametrus bei paskaičiuoti katalitinę bei fermento ir substrato reakingumo konstantas
4. Ištirti PQQ ADH katalizuojamos reakcijos pradinio greičio priklausomybes nuo buferinio tirpalo pH
5. Ištirti L95 lakazės katalizuojamos reakcijos pradinio greičio priklausomybes nuo FERRO ir ABTS, bei buferinio tirpalo pH
6. Naudojant deguoninį elektrodą ištirti deguonies sunaudojimo pradinio reakcijos greičio priklausomybes nuo lakazės, FERRO ir ABTS substratų koncentracijų
7. Naudojant deguoninį elektrodą ištirti deguonies sunaudojimą vykstant ADH IIG katalizuojamai glicerolio ir 1,2-propandiolio oksidacijai ir lakazės L95 katalizuojamai mediatoriaus (antrojo qADH substrato) regeneracijai, naudojant skirtingus mediatorius ir įvairias alkoholių koncentracijas.

Vadovė
(Parašas)

dr. Regina Vidžiūnaitė
(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

Užduotį gavau

.....
(Parašas)
Ana Chaleckaja
(Vardas, pavardė)
.....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN

Egz. sk.

Data-....-....

Bioinžinerijos studijų programos baigiamasis magistro darbas

Pavadinimas: **PQQ priklausomos alkoholio dehidrogenazės katalizuojamų alkoholių virsmų, naudojant įvairius mediatorius, tyrimai**

Autorius: **Ana Chaleckaja**

Vadovas: dr. **Regina Vidžiūnaitė**

Kalba

☒

lietuvių

☐

užsienio

Anotacija

Naudojant spektrofotometrinį metodą tirtas ADH IIG reakingumas su skirtingais mediatoriais ir įvairiais alkoholiais. Nustatytos tariamųjų kinetinių parametrų K_M ir V_{max} reikšmės, bei paskaičiuotos katalitinės ir bimolekulinės alkoholių oksidacijos bei mediatorių redukcijos reakingumo konstantos. Tirta FERO ir ABTS oksidacija katalizuojama L95 lakaze. Gautos pradinės reakcijos greičių priklausomybės nuo substratų koncentracijų. Rezultatų analizei pritaikius Michaelio-Menten lygtį, gautos tariamųjų K_M ir V_{max} reikšmės, iš kurių buvo paskaičiuotos katalitinės ir oksidacinės konstantos. Pamatytos pradinio reakcijos greičio priklausomybės nuo buferinių tirpalų pH ir jų komponentų, bei nustatytos optimalios substratų oksidacijos reakcijos pH reikšmės. Naudojant deguoninį elektrodą buvo registruotas deguonies sunaudojimas vykstant L95 lakazės katalizuojamai FERO ir ABTS oksidacijai ir paskaičiuotas pradinis reakcijos greitis bei sunaudoto deguonies priklausomybės nuo substratų koncentracijų. Registruotas ir deguonies sunaudojimas vykstant ADH IIG katalizuojamai alkoholio oksidacijai ir lakazes katalizuojamai mediatoriaus (antrojo qADH substrato) regeneracijai.

Darbą sudaro 6 dalys: įvadas, literatūros apžvalga, eksperimentinė dalis, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 85 p. teksto, 50 paveikslų, 8 lentelės, 109 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: alkoholio dehidrogenazė, lakazė, alkoholiai, mediatoriai, oksidacija, redukcija, pradinis reakcijos greitis, pH, aktyvumas.

Vilnius Gediminas Technical University
Fundamental sciences faculty
Chemistry and bioengineering department

ISBN ISSN
Copies No..
Date-....-....

Bioengineering study programme master thesis.

Title: Investigations of PQQ dependent alcohol dehydrogenase catalyzed alcohols conversion reactions by using various mediators

Author: Ana Chaleckaja

Academic supervisor: dr. Regina Vidžiūnaitė

Language

X	Lithuanian
	English

Annotation

Reactivity of ADH IIG with different mediators and various alcohols were investigated by spectrophotometric method. Values of apparent kinetic parameters K_M and V_{max} were determined, catalytic and bimolecular alcohols oxidation and mediators reduction reactivity constants were calculated. The FERRO and ABTS oxidation catalysed by L95 laccase were investigated. The initial reaction rate dependencies on the substrates concentrations were obtained. The analysis of the results was performed by applying Michael-Menten equation and the values of apparent K_M and V_{max} , as well as catalytic and oxidation constants were calculated. The dependencies of the initial reaction rate on the buffer solutions pH and their components were measured also the optimal pH of the substrates oxidation reactions were determined. The oxygen consumption was registered L95 laccase catalysed oxidation of FERRO and ABTS by oxygen electrode and initial reaction rate was calculated, as so as oxygen consumption dependences on substrate concentrations. The oxygen consumption ADH IIG catalysed oxidation of alcohols and laccases catalysed regeneration of mediators (second qADH substrate) were registered.

Structure: introduction, 3 chapters, conclusions, references.

Thesis consist of: 85 p. of text, 50 pictures, 8 tables, 109 bibliographical entries.

Keywords: alcohol dehydrogenase, laccase, alcohols, mediators, oxidation, reduction, the initial reaction rate, pH, activity.

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų
sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo
organizavimo tvarkos aprašo 2011–2012 m. m.
1 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Ana Chaleckaja, 20064049

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIfm-10

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)

SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2012 m. gegužės 27 d.

(Data)

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „PQQ priklausomos alkoholio dehidrogenazės katalizuojamų alkoholių virsmų, naudojant įvairius mediatorius, tyrimai“, patvirtintas 2011 m. spalio 26 d. dekanų potvarkiu Nr. 380fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: dr. Regina Vidžiūnaitė. Mano darbo vadovas dr. Regina Vidžiūnaitė.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjusi.

Ana Chaleckaja

(Parašas)

(Vardas ir pavardė)

TURINYS

IVADAS	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	15
1.1. Oksidoreduktazių charakteristika	15
1.1.1. Dehidrogenazės	15
1.1.2. Alkoholio dehidrogenazių struktūra ir funkcijos	17
1.2. Chinobaltymai	18
1.2.1. Chinobaltymų charakteristika ir fiziologinė svarba	18
1.2.2. Chino(hemo)baltymo alkoholio dehidrogenazės struktūra, funkcija ir fiziologija	20
1.2.3. ADH IIG kristalinė struktūra	25
1.2.4. Intramolekulinis elektronų perdavimas ir protono atlaisvinimas ADH IIG	31
1.3. Mediatoriai	32
1.3.1. Fericianidas	32
1.3.2. ABTS	32
1.3.3. DHDMP	33
1.4. Alkoholiai.....	34
1.5. Lakazės.....	41
1.5.1. Lakazių charakteristika.....	41
1.5.2. Lakazės aktyvaus centro struktūra	43
1.5.3. Katalizės mechanizmas.....	45
1.5.4. Lakazių panaudojimas	46
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS	49
2.1. Medžiagos ir metodai.....	49
2.1.1. Reagentai ir prietaisai	49
2.2. Tyrimo metodai	50
2.2.1. Spektrofotometrinis metodas	50
2.2.2. Deguoninis metodas	51
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	52
3.1. ADH IIG alkoholio dehidrogenazės substratinio specifiškumo alkoholiams tyrimas.....	52
3.1.1. ADH IIG reakingumo su įvairiais alkoholiais tyrimas.....	52

3.1.2. FERI, DHDMP ⁺ ir ABTS ⁺ reakingumo su redukuota ADH IIG tyrimas	55
3.1.3. pH įtaka ADH IIG aktyvumui.....	59
3.2. Spektrofotometriniai lakazės L95 katalizuojamų virsmų tyrimai	62
3.2.1. Spektrofotometriniai lakazės L95 katalizuojami substratų oksidacijos tyrimai	62
3.2.2. pH įtaka L95 aktyvumui	63
3.3. Tyrimai deguoniniu elektrodu	64
3.3.1. L95 lakazės katalizuojamų virsmų tyrimai deguoniniu elektrodu	64
3.3.2. Alkoholio oksidacijos katalizuojamos ADH IIG, kai ADH oksiduojantis mediatorius yra regeneruojamas, schema	67
3.3.3. Alkoholio biokonversijos sistemos tyrimai deguoniniu elektrodu.....	68
PADĖKA.....	75
LITERATŪRA	76

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Pirolochinolino chinono struktūra	18
2 pav. MDH tridimensė struktūra.	22
3 pav. Chinobaltymo ir chinohemobaltymo alkoholio dehidrogenazės PQQ domeno ir hemo c domeno filogeninis medis	25
4 pav. ADH IIG molekulės kristalinė struktūra	25
5 pav. ADH IIG PQQ domeno erdvinis vaizdas.....	27
6 pav. ADH IIG PQQ ir kalcio ligandų aplinka.....	28
7 pav. Vandensilio pernašos mechanizmas alkoholio substratų oksidacijos PQQ/Ca ²⁺ ADH IIG aktyvaus centro..	30
8 pav. ADH IIG struktūrinių ypatybių erdvinis vaizdas.....	31
9 pav. Fericianido struktūrinė formulė	32
10 pav. ABTS struktūrinė formulė.....	33
11 pav. DHDMP struktūrinė formulė.....	33
12 pav. Etanolio molekulės struktūra.....	34
13 pav. 1-oktanolio molekulės struktūra	35
14 pav. Izobutanolio molekulės struktūra	35
15 pav. 2-propanolio molekulės struktūra	36
16 pav. 1,2-propandiolio molekulės struktūra.	36
17 pav. 3-amino-1,2-propandiolio molekulės struktūra	37
18 pav. 3-chloro-1,2-propandiolio molekulės struktūra	38
19 pav. 2-amino-1,3-propandiolio molekulės struktūra	38
20 pav. (2S,3S)-(+)-2,3-butandiolio molekulės struktūra.....	38
21 pav. Glicerolio molekulės struktūra	39
22 pav. 2 - amino - 1 – feniletanolio molekulės struktūra.....	40
23 pav. 1,4:3,6-Dianhidro-D-mannitolo molekulės struktūra.....	40
24 pav. Dianhidro-D-glucitolo molekulės struktūra	41
25 pav. Tipinė lakazės katalizuojama reakcija	42
26 pav. Lakazės aktyvūs centras.....	44
27 pav. <i>Trametes versicolor</i> lakazės kristalografinė struktūra4528 pav. Lakazės katalizinis ciklas, rodantis fermento vario centro redukcijos ir oksidacijos mechanizmą	45
28 pav. Lakazės katalizinis ciklas.....	46
29 pav. FERI sugerties mažėjimo kinetinės kreivės, esant skirtingoms glicerolio koncentracijoms bei pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos, reakciją katalizuojant ADH IIG	52
30 pav. FERI sugerties mažėjimo kinetinės kreivės, esant skirtingoms 1,2-propandiolio koncentracijoms bei pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo 1,2-propandiolio koncentracijos, reakciją katalizuojant ADH IIG alkoholio dehidrogenaze	53
31 pav. FERI sugerties mažėjimo kinetinės kreivės, esant skirtingoms FERI koncentracijoms (A) bei pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo FERI koncentracijos (B), reakciją katalizuojant ADH IIG	56

32 pav. FERI sugerties mažėjimo kinetinės kreivės, esant skirtingoms FERI koncentracijoms bei pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo FERI koncentracijos, reakciją katalizuojant ADH IIG	56
33 pav. ADH IIG aktyvumo priklausomybė nuo pH su alkoholiais naudojant kaip mediatorių FERI.	60
34 pav. ADH IIG aktyvumo priklausomybė nuo pH su alkoholiais naudojant kaip mediatorių DHDMP	60
35 pav. ADH IIG aktyvumo priklausomybė nuo pH su alkoholiais naudojant kaip mediatorių ABTS ⁺	61
36 pav. Pradinio reakcijos greičio priklausomybės nuo ABTS ir FERO koncentracijų, reakciją katalizuojant L95 lakaze.....	62
37 pav. L95 aktyvumo priklausomybė nuo pH.....	63
38 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, esant skirtingoms FERO koncentracijoms, sunaudoto deguonies pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo FERO koncentracijos ir deguonies priklausomybė nuo FERO koncentracijos	64
39 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, esant skirtingoms FERI koncentracijoms ir sunaudoto deguonies pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo L95 koncentracijos oksiduojant ABTS	65
40 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, esant skirtingoms ABTS koncentracijoms, sunaudoto deguonies pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo ABTS koncentracijos ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo ABTS koncentracijos.....	66
41 pav. Lakaze katalizuojama regeneracijos sistema.....	67
42 pav. Deguonies koncentracijos kitimas laike, esant skirtingoms FERI koncentracijoms ir sunaudoto deguonies pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo FERI koncentracijos	68
43 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant FERO kaip mediatorių ir skirtingas glicerolio koncentracijas ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos	69
44 pav. ADH IIG inhibicija	70
45 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant FERO kaip mediatorių ir skirtingas 1,2-propandiolio koncentracijas ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo 1,2-propandiolio koncentracijos	70
46 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant DHDMP ⁺ kaip mediatorių ir skirtingas glicerolio koncentracijas ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos	71
47 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant DHDMP ⁺ kaip mediatorių ir skirtingas 1,2-propandiolio koncentracijas ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo 1,2-propandiolio koncentracijos	71
48 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant ABTS kaip mediatorių ir skirtingas glicerolio koncentracijas ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos	72
49 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant ABTS kaip mediatorių ir skirtingas 1,2-propandiolio koncentracijas ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo 1,2-propandiolio koncentracijos	72
50 pav. Sunaudoto deguonies priklausomybė nuo glicerolio ir 1,2-propandiolio koncentracijų.....	73

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Chinobaltymų ir chinohemobaltymų alkoholio dehidrogenazės ir su jomis susiję fermentai..	20
2 lentelė. Alkoholių oksidacijos, katalizuojamos ADH IIG, naudojant kaip mediatorių FERI, kinetiniai parametrai.....	53
3 lentelė. Alkoholių oksidacijos, katalizuojamos ADH IIG, naudojant kaip mediatorių DHDMP ⁺ , kinetiniai parametrai.....	54
4 lentelė. Alkoholių oksidacijos, katalizuojamos ADH IIG, naudojant kaip mediatorių ABTS ⁺ , kinetiniai parametrai.....	55
5 lentelė. FERI redukcijos, katalizuojamos ADH IIG, kinetiniai parametrai.....	57
6 lentelė. DHDMP ⁺ redukcijos, katalizuojamos ADH IIG, kinetiniai parametrai.	58
7 lentelė. ABTS ⁺ redukcijos, katalizuojamos ADH IIG, kinetiniai parametrai.	58
8 lentelė. Grybine L95 lakaze katalizuojamų substratų oksidacijos kinetinių parametrų reikšmės	63

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolino-6-sulfoninė rūgštis)

ABTS⁺ – 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolino-6-sulfoninė rūgštis) katijon-radikalas

ADH IIG – *Pseudomonas putida* HK5 alkoholio dehidrogenazė

DMSO – dimetilsulfoksidas

DHDMP⁺ – 5,10-dihidro-5,10-dimetilfenazinas

FERI – fericianidas

FERO – ferocianidas

k_{kat} – katalitinė konstanta

K_M – Michaelio-Menten konstanta

k_{oks} – oksidacinė konstanta

k_{red} – redukcinė konstanta

L95 – lakazė

PQQ – pirolochinolino chinonas

qADH – chinobaltymų alkoholio dehidrogenazė

rCiP – rekombinantinė *Coprinus cinereus* peroksidazė

V₀ – pradinis reakcijos greitis

V_{max} – maksimalus fermentinės reakcijos greitis

IVADAS

Oksidaciniai ir redukciniai fermentai, katalizuojantys elektronų mainų reakcijas, yra vienos iš svarbiausių biomolekulių biotechnologiniuose, biocheminiuose, nanobiotechnologiniuose procesuose.

Chinobaltymai sudaro dehidrogenazių klasę atskirą nuo nikotinamido-priklausomų ir flavino-priklausomų fermentų. Jie naudoja vieną iš keturių skirtingų chinono kofaktorių, paverčiant didžiulę alkoholių ir aminių įvairovę į jų atitinkamus aldehydus/laktatus. Baltymai, turintys pirolochinolino chinono kofaktorių, sudaro geriausiai apibūdintą ir didžiausią chinobaltymų subklasę (Oubree 1999).

Pirolochinolino chinonas (PQQ) buvo rastas daugiau nei 10 skirtinguose fermentų rūšyse, veikiančiuose daugiausia pirminiuose ir antriniuose hidroksilo grupių alkoholiuose arba cukruose dehidrinime. Šiuose fermentuose, PQQ nekovalentiškai jungiasi prie apofermento. Šie fermentai taip pat savo sudėtyje turi PQQ 1 mol Ca^{2+} /mol koordinuoja PQQ ir keletą amino rūgščių šoninių grandinių atomus ir reikalingi aktyvumui. Kai kurie iš šių chinobaltymų, kartu su PQQ, turi papildomas prostatines grupes, hemą c, viename polipeptide, vadinami chinohemobaltymais, atskiriami nuo kitų chinobaltymų, kurie savo sudėtyje turi tik chinono kofaktorių kaip prostatinę grupę.

Alkoholio dehidrogenazės (ADH) yra plačiai paplitusios tarp daugelio skirtingų tipų organizmų, pradedant nuo bakterijų iki žinduolių. Jos dažniausiai būna NAD(P) priklausomi fermentai, esantys citoplazmoje (Toyama *et al.* 2004). Priešingai, PQQ priklausomos ADH yra gana unikalios ir randamos nedaugelyje bakterijų rūšyse, α , β ir γ proteobakterijose, ir lokalizuotos tik periplazminėje ertmėje (Gomez-Manzo 2005). PQQ priklausomos ADH apima tiek chinobaltymo, tiek chinohemobaltymo tipų fermentus. Kai kurios yra tirpios periplazmoje, kitos yra surištos citoplazmos membranos paviršiaus išorėje. Kaip ir kitos chinobaltymų dehidrogenazės, chino(hemo)baltymo ADH sudaro vadinamąją „periplazminę alkoholio oksidazės sistemą“ kartu su membranos jungiančia kvėpavimo grandine. Jos veikia kaip pirminės dehidrogenazės, kurios perneša redukuotą ekvivalentą tiesiogiai į bakterinę aerobinę kvėpavimo grandinę periplazmoje (Toyama *et al.* 2004).

Chinobaltymų alkoholio dehidrogenazės (qADH), sudėtyje turinčios pirolochinolinchinoną, kaip prostatinę grupę, yra gaminamos kelių aerobinių bakterijų, daugelis iš kurių gali augti alkoholiuose kuris yra vienintelis anglies ir energijos šaltinis. PQQ nekovalentiškai, bet tvirtai jungiasi su qADH ir reakcijos proceso metu nepaleidžiamas, todėl qADH nereikalingas išorinis kofermentų įtraukimas. qADH efektyviai katalizuoja vienkrypčią oksidaciją, kuri yra naudinga produkcijos formavimui dideliu mastu.

qADH skirstoma į tris grupes (I-III tipai), neįskaitant metanolio dehidrogenazės (MDH), pagal jos molekulinės, katalitinės savybės ir vietą. Tarp šių qADH, II tipo ADH yra tirpus, monomerinis chinohemobaltymas, kuris turi platesnį substratinį specifiškumą nei kitos qADH, bet išlaiko aukštą selektyvumą chiraliniams antriniams alkoholiams.

Šio darbo tikslas yra ištirti PQQ priklausomos alkoholio dehidrogenazės katalizuojamus įvairių alkoholių virsmus naudojant skirtingus mediatorius. Darbo tikslui įgyvendinti iškeliami tokie uždaviniai:

1. Naudojant spektrofotometrinį metodą ištirti PQQ ADH katalizuojamos reakcijos pradinio greičio priklausomybes nuo substratų koncentracijų
2. Naudojant spektrofotometrinį metodą ištirti PQQ ADH katalizuojamos reakcijos pradinio greičio priklausomybes nuo mediatorių koncentracijų
3. Nustatyti tariamuosius kinetinius parametrus bei paskaičiuoti katalitinę bei fermento ir substrato reaktingumo konstantas
4. Ištirti PQQ ADH katalizuojamos reakcijos pradinio greičio priklausomybes nuo buferinio tirpalo pH
5. Ištirti L95 lakazės katalizuojamos reakcijos pradinio greičio priklausomybes nuo FERO ir ABTS, bei buferinio tirpalo pH
6. Naudojant deguoninį elektrodą ištirti deguonies sunaudojimo pradinio reakcijos greičio priklausomybes nuo lakazės, FERO ir ABTS substratų koncentracijų
7. Naudojant deguoninį elektrodą ištirti deguonies sunaudojimą vykstant ADH IIG katalizuojamai glicerolio ir 1,2-propandiolio oksidacijai ir lakazės L95 katalizuojamai mediatoriaus (antrojo qADH substrato) regeneracijai, naudojant skirtingus mediatorius ir įvairias alkoholių koncentracijas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Oksidoreduktazių charakteristika

Fermentai, kaip natūralieji gamtos katalizatoriai, yra labai skirtingo specifiškumo, reakingumo, turi daugybę naudingų fizikocheminių, katalizinių ir biologinių savybių, kurios galėtų būti plačiai panaudojamos įvairiose medicinos ir pramonės srityse (Burton 2003; Xu 2005). Šiais laikais, greitai vystantis ir plečiantis moderniosioms biotechnologijoms, fermentai yra kruopščiai ir sistemiškai kuriami kaip ekonomiškai perspektyvūs ir nekenksmingi aplinkai pramoniniai biokatalizatoriai (Jaeger 2004; Xu 2005).

Oksidoreduktazės yra plačiai paplitusios mikrobu, augalų ir gyvūnų organizmuose. Jos katalizuoja elektronų ar redokso ekvivalentų mainus tarp donorinių ir akceptorinių molekulių reakcijose, vykstant elektronų perdavimui, protonų abstrakcijai, vandenilio ekstrakcijai, hidrido pernašai, deguonies įterpimui ar kitiems reikšmingiems etapams (Xu 2005). Apskritai vyksta dvi pusinės reakcijos (viena oksidacijos ir viena redukcijos) ir aktyvuojami/transformuojami mažiausiai du substratai. Tam, kad galėtų įvykdyti savo fiziologinę funkciją, oksidoreduktazės turi įvairius redokso aktyvius centrus. Aktyviuosius centrus apgaubia oksidoreduktazių polipeptidų grandinė, kuri gali moduluoti jų selektyvumą, redokso potencialą, reakingumą, stabilumą ir atsparumą inhibicijai. Paprastai redokso centrai turi aminorūgščių liekanų (pvz., tirozino ar cisteino), metalo jonų ar kompleksų (pvz., Cu, Fe, Mo, Fe-S ar hema) ir kofermentų (pvz., FMN, FAD, pteriną, PQQ ar PPQ) (Munro 2000).

Pagal panaudojimo sritį oksidoreduktazės gali būti klasifikuojamos priklausomai nuo jų pagrindinės katalizės ir/ar kofermentų priklausomybės į:

1. Oksidazes (pvz. *Cu-priklausoma oksidazė* - lakazė)
2. Peroksidazes (pvz. *Heminė peroksidazė* - krienų peroksidazė; *katalazė*)
3. Oksigenazes/hidroksilazes (pvz. *Flavino-priklausoma oksigenazė/hidroksilazė*)
4. Dehidrogenazes/reduktazes (pvz. *Chinono-priklausoma dehidrogenazė* - alkoholio dehidrogenazė) (Xu 2005).

1.1.1. Dehidrogenazės

Dehidrogenazė yra oksidoreduktazių klasės fermentas, katalizuojantis protonų pernašą nuo substrato ir elektronų poros – akceptoriumi. Jos gali būti suskirstytos į dvi pagrindines kategorijas: tos, kurios naudoja piridino nukleotido kofermentus, tokius kaip NAD arba NADP, ir tos, kurios savo sudėtyje turi flavinus, tokius kaip FAD arba FMN kaip prostatinę grupę. Tiriant metanolio

dehidrogenazę (EC 1.1.99.8), išskirtą iš metilotrofinės bakterijos, buvo charakterizuota trečia dehidrogenazės klasė, kurią sudaro chinonas, 2,7,9-trikarboksi-1H-pirol(2,3-f)chinolin-4,5-dionas (PQQ), kaip prostatinė grupė. Tolimesni tyrimai rodo, kad kai kurios oksidoreduktazės, išskirtos iš bakterijų ir žinduolių organizmų, taip pat turi PQQ.

Oksidoreduktazės, ypač NAD(P)-priklausomos dehidrogenazės yra plačiai naudojamos fermentų analizėje. Chinobaltymų oksidoreduktazės yra svarbios tiriant substratus, tokius kaip alkoholiai, aldehydai ir laktatai (Anthony 2006).

Dehidrogenazės skirstomos į:

- Acetaldehido dehidrogenazę (ALDH, EC 1.2.1.10) – dehidrogenazės fermentas, kuris katalizuoja acetaldehido virtimą į acto rūgštį (Thurner *et al.* 1997)
- Aldehido dehidrogenazę (ALDH, EC 1.2.1.3) – fermentų grupė, katalizuojanti aldehydų oksidaciją (Prasmickaitė *et al.* 2010)
- Alkoholio dehidrogenazę (ADH, EC 1.1.1.1) - katalizuoja alkoholių, aldehydų ir ketonų tarpusavio transformaciją (Courcy *et al.* 2009)
- Formiato dehidrogenazę (FDH, EC 1.2.1.2) – katalizuoja formiato jonų oksidaciją iki anglies dioksido NAD^+ į NADH redukcijos metu (Tishkov *et al.* 2004)
- Glicerinaldehido-3-fosfato dehidrogenazę (GAPDH, EC 1.2.1.12) – katalizuoja glikolizės šeštąją pakopą ir tokių būdu padeda suskaidyti gliukozės anglies molekules (Kuravsky *et al.* 2011)
- Gliukozės dehidrogenazę (GDH, EC 1.1.99.17) – katalizuoja monosacharidų, pavyzdžiui, gliukozės, ksilozės ir galaktozės, taip pat disacharidų, tokių kaip laktozė ir melibiozė, oksidaciją (Dokter *et al.* 1986)
- Glutamato dehidrogenazę (GLDH, EC 1.4.1.2) – fermentas, katalizuojantis grįžtamą reakciją L-glutamato rūgšties virsmą į α -ketoglutaniną (Harper *et al.* 2010)
- Laktato dehidrogenazę (LDH, EC 1.2.1.27) – katalizuoja piruvato redukciją NADH, susidarant laktatui ir NAD^+ (Goffin *et al.* 2004)
- Sorbitolio dehidrogenazę (SDH, EC 1.1.1.14) – angliavandenių apykaitos fermentas, paverčia sorbitolį, cukraus alkoholio gliukozės formą į fruktozę (Negm *et al.* 1979)
- Kt.

Šiame darbe naudota nuo pirolochinolinchinono priklausoma alkoholio dehidrogenazė, išskirta iš *Pseudomonas putida* HK5 (ADH IIG) - priskiriama oksidoreduktazėms, kurioms reikalingas kofaktorius

pirolochinolinchinonas. Taip pat buvo naudota L95 lakazė. Ji priskiriama prie mėlynųjų daugiavarių oksidazių grupės, kurios katalizuoja įvairių fenolinių junginių oksidaciją, naudodamos deguonį.

1.1.2. Alkoholio dehidrogenazių struktūra ir funkcijos

Alkoholio dehidrogenazė (ADH) (Alkoholis: NAD oksidoreduktazė, EC 1.1.1.1) – yra dehidrogenazės fermentų grupė, katalizuojanti alkoholių ir acetalių oksidaciją iki aldehidų ir ketonų, esant NAD (Courcy *et al.* 2009). Alkoholio dehidrogenazės yra dimerai, susidedantys iš identiškų 40 kDa molekulinės masės subvienetų (Hamada 2009). Kiekvienas subvienetas turi vietas, kurios dalyvauja substrato ir kofermento – NAD surišimo centrų susidaryme (Ащмарин 2003). Alkoholio dehidrogenazės yra fermentai, kurių molekulinė masė yra apie 150 kDa (Jorvall 1977). ADH gali katalizuoti daug skirtingų alkoholių oksidaciją įskaitant: pirminę, antrinę, ciklinę antrinę arba hemi-acetalio struktūrą (Courcy, *et al.* 2009). Šie fermentai randami daugelyje organizmuose: žinduoliuose, bakterijose, mielėse, augalų audiniuose, vabzdžiuose ir žuvyse (Ащмарин 2003). Pirmoji išskirta alkoholio dehidrogenazė buvo išgryninta ir gauti jos kristalai Negelein and Wulff 1937 m. iš *Saccharomyces cerevisiae* (kepimo mielių). Daugelis arklio kepenų ADH fermento katalitinio mechanizmo aspektų buvo tirti Hugo Theorello ir jo bendradarbių (Theorell 1961). Nustatyta, kad ADH buvo vienas iš pirmųjų oligomerinių fermentų, kurių amino rūgščių seka ir tridimensinė struktūra buvo išaiškinta. 1960 m. pradžioje tai buvo aptikta *Drosophila* genties vaisinėse muselėse (Hellgren 2009). Augaluose alkoholio dehidrogenazės rastos pupelėse, kopūstuose, žirniuose, rapsuose, saulėgrąžose, ryžiuose ir įvairiose kitose daržovėse (Leblova *et al.* 1977).

Alkoholio dehidrogenazės klasifikuojamos pagal metalo priklausančius į tris grupes:

- Turinčios cinko joną;
- Turinčios bet kokį metalo joną;
- Turinčios geležies joną (Sun 1992).

Zn-priklausomos dehidrogenazės rastos bakterijuose, žinduoliuose, augaluose ir ir grybuose. Jos yra dimeriniai arba tetrametriniai fermentai, kuri suriša du cinko atomus subvienete. Viena iš geriausiai apibūdintų Zn-priklausomų fermentų šeima yra Zn-priklausoma alkoholio dehidrogenazės šeimos vidutinio ilgio grandinė, kuri katalizuoja pirminių ir antrinių alkoholių oksidaciją iki aldehidų ar ketonų, naudojant NAD(P) kaip kofaktorių .

Kitos klasės alkoholio dehidrogenazės priklauso chinofermentams, kuriems reikalingas chinono kofaktorius kaip fermentų sujungimo elektronų akceptorius. Tipiškas šio fermento tipo pavyzdys yra metanolio dehidrogenazė, išskirta iš metilotrofinių bakterijų.

1.2. Chinobaltymai

1.2.1. Chinobaltymų charakteristika ir fiziologinė svarba

Sąvoka chinobaltymas pirmą kartą buvo pavartota apie 1980 m. Duine ir Frankui įtraukiant dehidrogenazes, kurios kaip savo prostetinę grupę sudaro pirolochinolino chinonas. Chinobaltymai sudaro fermentų, kurie katalizei naudoja chinono kofaktorius, klasę (Oubrie *et al.* 1999). Chinobaltymai yra palyginti nauja oksidoreduktazių klasė, kurios turi vieną iš keturių skirtingų chinono junginių vietoj nikotinamido ar flavino kofaktorių. Jos apima dehidrogenazes, turinčias chinoninės prigimties prostetines grupes. Šie baltymai oksiduoja platų alkoholių ir amino turinčių substratų įvairovę iki atitinkamų aldehydų arba ketonų (Oubrie *et al.* 1999; Saab–Rincón *et al.* 2009). Didžiausią ir geriausiai apibūdintą baltymų pogrupę sudaro baltymai, kurių sudėtyje yra kofaktorius pirolochinolino chinonas – 2,7,9-trikarboksi-1H-pirol(2,3-f)chinolin-4,5-dionas (1 pav.) (Oubrie *et al.* 2000). Pirolochinolino chinonas buvo identifikuotas 1979 m. kaip naujas kelių prokariotinių dehidrogenazių kofaktorius (Anthony *et al.* 1998).



1 pav. Pirolochinolino chinono struktūra

Chinobaltymų istorija prasidėjo 1960 m., kai Hauge apibūdino gliukozės dehidrogenazę, taip pat Anthony ir Zatmanas charakterizavo metanolio dehidrogenazę, kurios savo sudėtyje turi naujas prostetines grupes. Dar po 10 metų Duine, Frankas ir jų bendradarbiai pademonstravo, kad metanolio dehidrogenazė, turinti savyje prostetinę grupę, chinono struktūrą, sudarytą iš dviejų azoto atomų. Taip pat Kennardo grupė, panaudojusi rentgeno spindulių difrakcijos analizę, nustatė, kad tai yra PQQ (Anthony 1996). Vėliau Duine ir Frankas iš Delfto, taip pat Ameyama ir Adachi iš Yamaguchi parodė, kad PQQ grupių turi ir kitos bakterinės dehidrogenazės. Šie chinobaltymai paprastai katalizuoja

pirmiausia alkoholių ir cukrų oksidaciją bakterijos periplazmoje, taip prisidedami prie ATP formavimo (Anthony *et al.* 1998).

PQQ yra labai svarbus kofermentas alkoholio dehidrogenazės, apofermento, kuris reikalingas alkoholio metabolizmui kepenyse. Įrodyta, kad pirolochinolino chinonas randamas daugelyje žmogaus organizmo audinių, kietuose ir skystuose maisto produktuose, įskaitant ir motinos pieną. 2003 m. žurnalas „Nature“ paskelbė straipsnį, kuriame pirolochinolino chinonas apibūdinamas kaip „...naujas vitaminas, kuris yra žinduolių organizme redokso reakcijų kofermentas“ (Kasahara *et al.* 2003: 10).

PQQ yra lengvai tirpstanti vandenyje termostabili medžiaga, dalyvaujanti cikliniuose oksidacijos ir redukcijos reakcijose. Esant aminorūgštims pirolochinolino chinonas sudaro didelį kiekį imidazolinių ir oksazolinių darinių.

Pirolochinolino chinonas gali būti sintetinamas daugelio bakterijų. Išimtis yra plonosios ir storosios žarnų bakterijos. Tuo pačiu metu šios bakterijos PQQ naudoja kaip vitaminą. Pirolochinolino chinonas randamas augalų ir gyvūnų audiniuose, atitinkamai gyvulinės ir augalinės kilmės maisto produktuose.

PQQ yra svarbus ląstelių ir viduląstelių struktūrų (mitochondrijų skaičius ir dydis) augimui ir vystymuisi, normaliam nėštumui, vaisiaus bei kūdikio augimui ir vystymuisi. Įrodytas jo dalyvavimas imuninės sistemos funkcionavime. Maisto papildai, savo sudėtyje turintys nanomolinius kiekius pirolochinolino chinono, padidina B ir T limfocitų aktyvumą.

Pirolochinolino chinonas yra stiprus antioksidantas. Jis atlieka tokias funkcijas kaip:

- Kepenų apsaugos funkciją nuo įvairių patogeninių poveikių
- Apsaugo nuo kataraktos vystymosi
- Padeda nuo uždegimo, uždegimo metu mažina patinimą (Tracy 2000).

Rentgeno spindulių kristalografiniai tyrimai labai įtakojo PQQ priklausomų fermentų struktūros ir funkcijos sampratą (Kay *et al.* 2006). Buvo apibūdintos dvi skirtingos PQQ priklausomų alkoholio dehidrogenazių (ADH) rūšys. Pirmasis tipas apima chinobaltymo etanolio dehidrogenazės (EDH) iš kelių *Pseudomonas* rūšių ir chinobaltymo metanolio dehidrogenazės (MDH) iš metilotrofinių bakterijų. Antrasis PQQ priklausomų ADH tipas yra chinohemobaltymo alkoholio dehidrogenazės (QH-ADH) (Jongejan *et al.* 1998).

1.2.2. Chino(hemo)baltymo alkoholio dehidrogenazės struktūra, funkcija ir fiziologija

Jei NAD(P) priklausomos alkoholio dehidrogenazės yra plačiai paplitusios tarp daugelio skirtingų tipų organizmų, pradedant nuo bakterijų iki žinduolių, ir dažniausiai jie randami citoplazmoje (Toyama *et al.* 2004), tai, PQQ priklausomos ADH yra gana unikalios ir randamos nedaugelyje bakterijų rūšių, α , β ir γ proteobakterijose, ir lokalizuotos tik periplazminėje ertmėje (Gomez-Manzo 2005). PQQ priklausomos ADH apima tiek chinobaltymo, tiek chinohemobaltymo tipų fermentus. Kai kurios yra tirpios periplazmoje, kitos yra surištos citoplazmos membranos paviršiaus išorėje. Kaip ir kitos chinobaltymų dehidrogenazės, chino(hemo)baltymo ADH sudaro vadinamąją „periplazminę alkoholio oksidazės sistemą“ kartu su membranais jungiančia kvėpavimo grandine. Jos veikia kaip pirminės dehidrogenazės, kurios perneša redukuotą ekvivalentą tiesiogiai į bakterinę aerobinę kvėpavimo grandinę periplazmoje (Toyama *et al.* 2004).

PQQ priklausoma ADH yra didžiausia chinobaltymų šeimos grupė. Jos nariai sudaro 18 skirtingų fermentų (1 lentelė). Chino(hemo)baltymo alkoholio dehidrogenazės, kurios kaip savo prostatinę grupę turi pirolochinolino chinoną, yra skirstomos į tris grupes: I, II ir III tipai. I tipo ADH yra paprastas chinobaltymas, turintis PQQ kaip prostatinę grupę, o II ir III tipai ADH yra chinohemobaltymai, turintys hemą c, o taip pat PQQ katalitiniame polipeptide. II tipo ADH yra tirpus periplazminis fermentas, kuris yra plačiai paplitęs proteobakterijose, pavyzdžiui *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Comamonas* ir t. t. Priešingai nei II tipo ADH, III tipo ADH yra membraną jungiantis fermentas, veikiantis ant periplazminio paviršiaus išimtinai acto rūgšties bakterijose. Pastaroji sudaryta iš trijų subvienetų, du iš kurių sudaro chinohemobaltymo katalizinį subvienetą ir trijų hemų citochromo c subvienetą (Anthony 1993; Marcinkevičienė *et al.* 2006).

1 lentelė. Chinobaltymų ir chinohemobaltymų alkoholio dehidrogenazės ir su jomis susiję fermentai

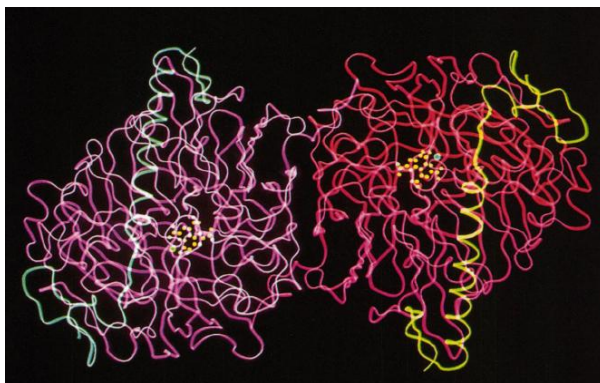
Fermentai			*Lokalizacija	Organizmai
			S arba M	
<i>Chinobaltymai,</i>	<i>galintys</i>	<i>oksiduoti</i>		
<i>alkoholius</i>				
Metanolo dehidrogenazės (MDH)			S	<i>Methylotrrops</i>
<i>I ADH tipas (PQQ)</i>				
Etanolio dehidrogenazė (qEDH)			S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Alkoholio dehidrogenazė (ADH I)	S	<i>Pseudomonas putida</i>
1-butanolio dehidrogenazė (BOH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i>
Polipropileno glikolo dehidrogenazė (PPGDH)	S	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Kiti chinobaltymai, galintys oksiduoti alkoholius		
Sorbozė/Sorbosono dehidrogenazė	S	<i>Gluconobacter species</i> <i>Pseudogluconobacter saccharoketogenes</i>
Glicerolio dehidrogenazė (GLDH)	M	<i>Gluconobacter species</i>
Chinohemobaltymai, galintys oksiduoti alkoholius		
<i>II ADH tipas (PQQ/hemas c)</i>		
Vanilil alkoholis arba polietileno glikolio dehidrogenazė (PEGDH)	S	<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>
Etanolio dehidrogenazė (qhEDH)	S	<i>Comamonas testosterone</i>
Alkoholio dehidrogenazė (ADH IIB)	S	<i>Pseudomonas putida</i>
Alkoholio dehidrogenazė (ADH IIG)	S	<i>Pseudomonas putida</i>
Polivinilalkoholio dehidrogenazė (PVADH)	S	<i>Pseudomonas sp.</i>
Tetrahidrofurfurilo alkoholio dehidrogenazė (THFADH)	S	<i>Ralstonia eutropha</i>
1-butanolio dehidrogenazė (BDH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i>
<i>III ADH tipas (PQQ/hemas c/3 hemai c)</i>		
Alkoholio dehidrogenazė	M	<i>Acetobacter aceti</i>
Alkoholio dehidrogenazė	M	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
Alkoholio dehidrogenazė	M	<i>Gluconoactobacter polyoxygens</i>
Alkoholio dehidrogenazė	M	<i>Acidomonas methanolicus</i>
Alkoholio dehidrogenazė	M	<i>Gluconobacter suboxydans</i>
Kiti susiję chinohemobaltymai		
Lupanino hidroksilazė (PQQ/hemas c)	S	<i>Pseudomonas sp.</i>
Amino dehidrogenazė (CTQ/hemas c)	S	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Paraccocus denitrificans</i>

* tirpus (S) arba membraną jungiantis (M) (Toyama *et al.* 2004).

1.2.2.1. Chinobaltymų ir chinohemobaltymų alkoholio dehidrogenazių rūšys ir pasiskirstymas

Dažniausiai tiriamos PQQ priklausamos alkoholio dehidrogenazės yra metanolio dehidrogenazės. MDH yra tik PQQ priklausantis chinobaltymas. Šis tirpus periplazminis fermentas, yra heterotetrameras, sudarytas iš dviejų didelių ir dviejų mažų subvienetų ($\alpha_2\beta_2$) (Kay 2006). Metanolio dehidrogenazės kiekvienas subvienetas (60-66 kDa) turi vieną PQQ molekulę ir Ca^{2+} joną (2 pav.) (Anthony 2004). β subvienetas yra labai mažas (8.5 kDa) ir jo funkcija nėra žinoma. Maži β subvienetai susilenka aplink α subvienetų paviršių. α subvienetas yra supervamzdis, kurį sudaro aštuoni radialiai išdėstę lakštai (Afolabi *et al.* 2001).



2 pav. MDH tridimensė struktūra. α spiralės pavaizduotos rožine ir violetine spalvomis, β klostės – žalia, PQQ – oranžine. Kalcio jonai pažymėti mėlynais rutuliukais (Anthony 1994)

Metanolio dehidrogenazė oksiduodama metanolį į formaldehidą ir metanolis yra vienintelis anglies šaltinis. Taip pat šis fermentas sugeba oksiduoti platų spektrą pirminių alkoholių, rodanti šiems substratams didelį giminingumą (metanolio K_M yra 5-20 mM), tačiau blogai oksiduoja antrinius alkoholius. Šiam fermentui kaip aktyvatorius yra reikalingas amonis ir jo aktyvumas gali būti matuojamas spektrofotometriškai su fenazino metalosulfatu, bet ne su fericianidu (Gomez-Manzo 2005).

Kaip parodyta 1 lentelėje, iš keturių skirtingo I tipo chinobaltymo alkoholio dehidrogenazių keletas iš jų buvo išskirtos iš *Pseudomonas* rūšių ir viena iš *Stenotrophomonas* rūšies, abi dehidrogenazės priklauso γ proteobakterijoms. Jos visos tirpūs fermentai ir veikiantys periplazmoje (Tachibana *et. al.* 2003). Etanolio dehidrogenazė, kuri panaši į MDH, buvo išskirta iš *Pseudomonas aureginosa* ir *Pseudomonas putida* (Toyama 1995). Šis fermentas turi gana didelį pH optimumą (pH 7.7), kaip ir metanolio dehidrogenazės atveju, kaip aktyvatorius reikalingas amonis, sugeba oksiduoti platų spektrą įvairių alkoholių, įskaitant antrinius alkoholius (Gomez-Manzo 2005). Jų absorbcijos spektrai yra labai panašūs į metanolio dehidrogenazės, bet turi mažą giminingumą metanoliui. Etanolio K_M yra 15 mM, o metanolio yra maždaug 1000 kartų didesnė. I tipo alkoholio dehidrogenazės fermentas

iš *P. aureginosa*, iš pradžių buvo apibūdintas kaip monomeras su dviem PQQ molekulėmis (101 kDa kiekviena), tačiau šis fermentas turi tą pačią kaip metanolio dehidrogenazė struktūrą ($\alpha_2\beta_2$ tetrameras) (Gorisch 1989). Visi paminėti fermentai yra tirpūs ir veikiantys periplazminėje aplinkoje. Iš jų išskirtinė yra glikolio dehidrogenazė, nes ji neoksiduoja alkoholių. Du papildomi fermentai, tirpi sorbozė/(sorbosono) dehidrogenazė ir membraną jungianti glicerolio dehidrogenazė, taip pat gali būti laikoma I tipo ADH, nors jų fiziologiniai substratai nėra alkoholiai, kadangi šie fermentai taip pat gali oksiduoti kelis alkoholius su dideliu efektyvumu (Gomez-Manzo 2005).

II tipo ADH buvo nustatyti septyni skirtingi chinohemobaltymai, kurie buvo išskirti iš proteobakterijų, tokių kaip *Rhodopseudomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* ir *Comamonas* rūšys (1 lentelė). Du II tipo ADH, ADH IIB ir ADH IIG, yra produkuojami vienu bakterijų kamienų, *Pseudomonas putida* HK5, kartu su kita I tipo ADH, ADH I, esančia substrato alkoholių terpėje, pridant į mitybinę terpę anglį kaip energijos šaltinį (Toyama *et al.* 2004). 1-butanolio dehidrogenazė (BDH) taip pat yra produkuojama kartu su kita 1-butanolio dehidrogenaze (BOH), kuri yra I tipo ADH, išskirtos iš vieno kamieno, *Pseudomonas butanovora*. Šiuo atveju, tiek I tipo, tiek II tipo fermentai yra indukuojami kartu su tais pačiais alkoholiais (Vangnai *et al.* 2002).

Chinohemobaltymo periplazminė etanolio dehidrogenazė buvo išskirta iš *Comamonas testosteroni*. Šis fermentas yra monomeras (71 kDa), kurį sudaro dvi prostetinės grupės, viena PQQ molekulė ir vienas hemas c. QhEDH turi platų diapazoną savito aktyvumo pirminiams ir antriniam alkoholiams bei aldehidams, tačiau metanolio neoksiduoja (Gomez-Manzo 2005).

1 lentelėje yra paminėti du papildomi susiję chinohemobaltymai, lupanino hidroksilazė ir amino dehidrogenazė, išskirti iš *Pseudomonas* ir *Paraccocus* rūšių, nors visiškai nesugeba oksiduoti alkoholių. Lupanino hidroksilazė sudaro 1 mol PQQ ir hemas c, taip pat jos amino rūgšties seka turi didelį panašumą II tipui ADH laipsnį (Hopper *et al.* 1998; Hopper *et al.* 2002). Amino dehidrogenazė, kuri neseniai išskirta ir kristalizuota, yra visiškai kitoks chinohemobaltymas, sudarantis cisteino triptofilo chinono kofaktoriaus ir dviejų hemo c dalių $\alpha\beta\gamma$ heterotetramero kovalentinį ryšį (Datta *et al.* 2001; Satoh *et al.* 2002.). Nors ši amino dehidrogenazė yra nepanaši į chinohemobaltymo ADH, ji turi panašias savybes II ir III tipui ADH intramolekuliniu ir tarpmolekuliniu elektronų perdavimo stadijos periodu (Toyama *et al.* 2004).

Branduolinio magnetinio rezonanso tyrimai parodė, kad PQQ sujungimas sukelia baltymo konformacinius pokyčius dėl metionino perorientavimo, prijungiant prie hemo c, taip pat pirolo žiedo elektronų tankio padidėjimą ir hemo oksidacijos - redukcijos potencialo padidėjimą (De Jong *et al.*

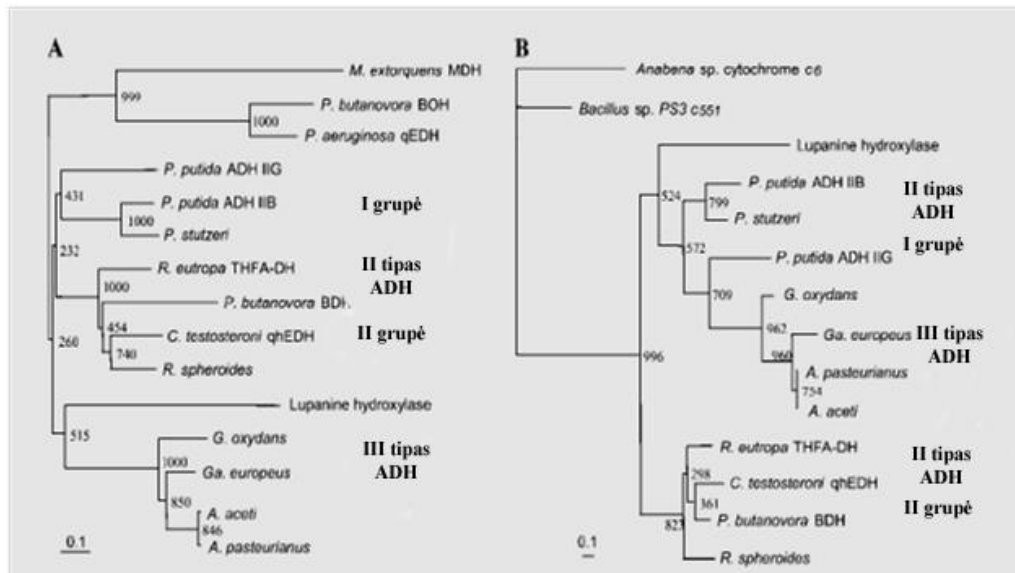
1995). Gauti duomenys rodo, kad elektronų perdavimas vykdomas nuo PQQ redukuotos formos į hemo c (oksidacijos-redukcijos potencialas lygus 140 mV), o iš ten perduodamas į elektronų akceptorius endogeniniu (in vivo) arba išoriniu (in vitro) būdais (Frebortova *et al.* 1997).

III tipas ADH sudaryta iš trijų subvienetų, chinoxemobaltymo I subvieneto, trisheminio c tipo citochromo II subvieneto ir III subvieneto, kuris neturi kofaktoriaus ir randamas tik acto rūgšties bakterijose, vienintelėje α proteobakterijų grupėje. Šio tipo penkios skirtingos alkoholio dehidrogenazės buvo išskirtos iš *Acetobacter*, *Gluconoactobacter*, *Acidomonas* ir *Gluconobacter* rūšių (Toyama *et al.* 2004, Kondo 1997).

III tipo ADH oksiduoja alkoholį iki acto rūgšties, gaminant actą. Šiems fermentams nėra reikalingas amonis, kaip aktyvatorius, ir jų pH optimumas yra tarp 4,0-6,0 (Gomez-Manzo 2005). Lyginant su kitomis chinobaltymų alkoholio dehidrogenazėmis, jos turi gana siaurą substratinį specifiškumą ir geriausiai oksiduoja pirminius alkoholius, tačiau neoksiduoja nei metanolio, nei antrinių alkoholių ir rodo aktyvumą su formaldehidu ir acetaldehidu (Matsushita *et al.* 1996).

PQQ domeno filogeninė priklausomybė tarp šių PQQ priklausomų alkoholio dehidrogenazių gali būti nubrėžta taip, kaip parodyta 3 A pav. I tipo ADH yra glaudžiai susirišusi į MDH, tokiu būdu abi yra evoliuciškai susirišusios. II tipo ADH PQQ domenas ir III tipo ADH chinoxemobaltymo subvienetas yra glaudžiai susiję tarpusavyje ir gauti iš I tipo ADH ar MDH. III tipas ADH yra labiau susijęs tarpusavyje, o II tipo ADH turi daugiau skirtumų ir gali būti suskirstytas į dvi grupes. Pirmos grupės fermentai iš *P. Putida* ir *P. Stutzeri*, kurie abu yra γ proteobakterijų. Antra fermentų grupė yra iš *R. eutropha*, *P. Butanovora*, *C. Testosteroni* ir *R. spheroides*, kurie visi yra klasifikuojami kaip α , β proteobakterijos.

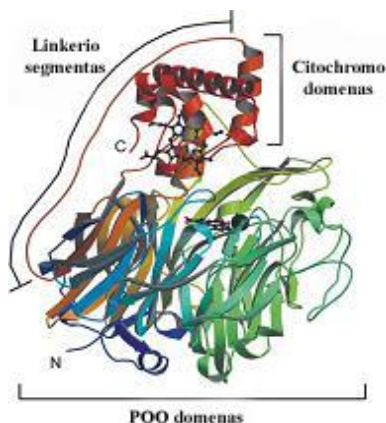
Hemo c domenai yra vienodai gerai išsaugomi II tipo ADH I ir II grupių viduje, skirtumas pagrįstas jų PQQ domeno. Tarp III tipo ADH (3 pav., B) abu hemo c domenai ir PQQ domenas turi stiprų evoliucinį giminingumą tarp jų. Chinoxemobaltymų hemo c domenai turi tam tikrą homologijos seką *P. aureginosa* nitrito reduktazės citochromo c subvienete, *Anabaena sp.* PCC7120 citochromo c6 ir *Bacillus sp.* PS3 citochromo c551. Kai chinoxemobaltymų hemo c domenų filogeninis medis yra brėžiamas ir lyginamas su cianobakterija ir bacillus citochromais, hemo domenas yra suskirstomas į dvi grupes, kurios sudaro ketletą ADH tipų. III tipo ADH citochromo domenas, išskirtas iš II tipo ADH iš *P. putida* ir *P. stutzeri* (3 pav., B).



3 pav. Chinobaltymo ir chinohemobaltymo alkoholio dehidrogenazės PQQ domeno (A) ir hemo c domeno (B) filogeninis medis (Toyama *et al.* 2004)

1.2.3. ADH IIG kristalinė struktūra

ADH IIG trimatė struktūra buvo nustatyta rentgeno kristalografijos būdu 2.2 Å rezoliucijos (4 pav.). Modelis susideda iš dviejų domenų, PQQ priklausomo N-galinio domeno, sudaryto iš 567 amino rūgščių liekanų (Ala1–Leu567) ir C-galinio c-tipo citochromo domeno, susidedančio iš 94 amino rūgščių liekanų (Asp591–Ser684), paskutinės penkios (Ala685–His689) amino rūgščių liekanos nedalyvauja. Du domenai sujungia prolinu praturtintą linkerio 23 amino rūgščių liekanų (Gly568–Asn590) fragmentą (Toyama *et al.* 2005).

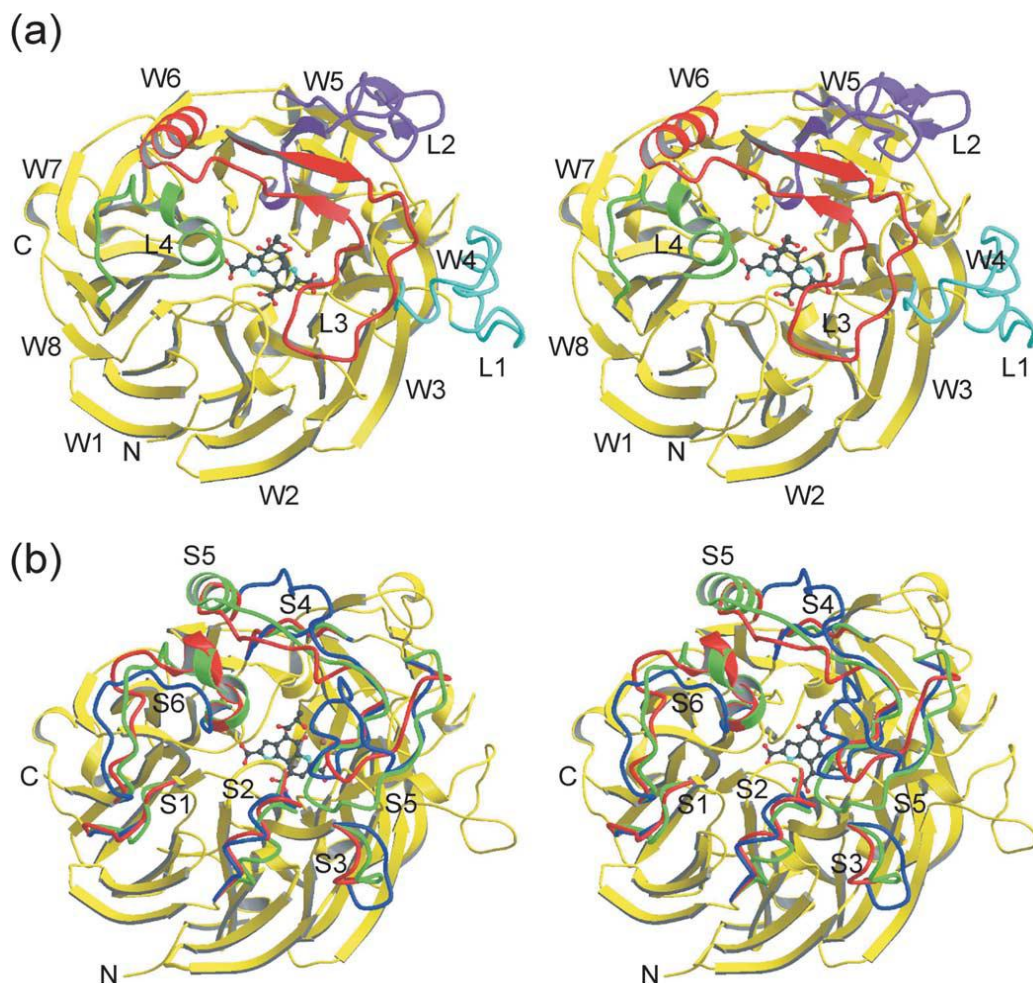


4 pav. ADH IIG molekulės kristalinė struktūra. PQQ ir kalcio jonas išsidėstęs apatiniame dideliame β klostės domene ir hemo grupė - viršutiniame mažame citochromo domene (viršuje esanti geltona spiralė priklauso chinobaltymų domenui)

1.2.3.1. PQQ domenas

PQQ domenas susideda iš aštuoniukės formos β propelerio mentės struktūrų, labai panašių į kitus chinobaltymus ir chinohemobaltymus, labiausiai į chinobaltymų ADH IIB ir qhEDH domenus. Aštuoniukės formos β propelerio mentės (W motyvai), sudarytos iš keturių vijų antiparalelinių β lakštų, sudaro žiedą su apvalia 8 kartų pseudosimetrija, taip vadinama „supersvamzdžio“ struktūra, su pirmąja β vija, dalyvaujančia paskutiniame W motyve (W8) (5 pav., a). PQQ yra supervamzdyje ir yra sutelktas pseudometrijos 8 kartų ašies centre, prie citochromo supervamzdžio pabaigos (4 pav.). ADH IIG supervamzdį sudaro 20–45 liekanų ilgio keturi kilpiniai intarpai (L1-L4), kurie sujungia β klosčių poras tarp β propelerio mentės arba toje pačioje β propelerio mentėje (5 pav. a). Keturios kilpos, L1-L4, sujungia W3-W4, W5-W6 motyvus, W6 2–3 gijas ir W8 2–3 gijas, atitinkamai. Kilpos topologiškai orientuotos taip, kad apimti supervamzdžio PQQ priklausomą pusę ir sudaryti ryšį su citochromo domenu.

Lygiaverčių Ca vietų kvadratinio vidurkio ilgio nuokrypis ADH IIG chinobaltymų domene, lyginant abi ADH IIB ir qhEDH, yra $0.88\text{\AA}$ 515 liekanom su 56–58% sekos tapatybe tarp suderintų liekanų. Atlikti tyrimai parodė, kad polipeptidų 13 ir 14 segmentai labai skiriasi konfirmacija (po $1\text{\AA}$ ir daugiau trims ar daugiau nuoseklei einančiom liekanom) tarp ADH IIG ir ADH IIB arba qhEDH. Iš 12 segmentų, bendrų visoms trimis struktūroms, šešios parodytos 5 b pav., sudaro segmentus, kurie gali turėti teigiamą funkcinę svarbą sąveikai su substratu, citochromo domenu ar kitais panašiais segmentais. Kartu jie apibrėžia paviršiaus sąveiką trijų chinohemobaltymų citochromo domenų sujungimui. Toks segmentas yra 5 numeris, išsidėstęs 3 kilpoje (tarp 6 mentės 2 ir 3 vijų), kuris sudaro ADH IIG 12 liekanų spiralę. Ji yra ilgiausia, sudaryta iš 26 ar daugiau liekanų.

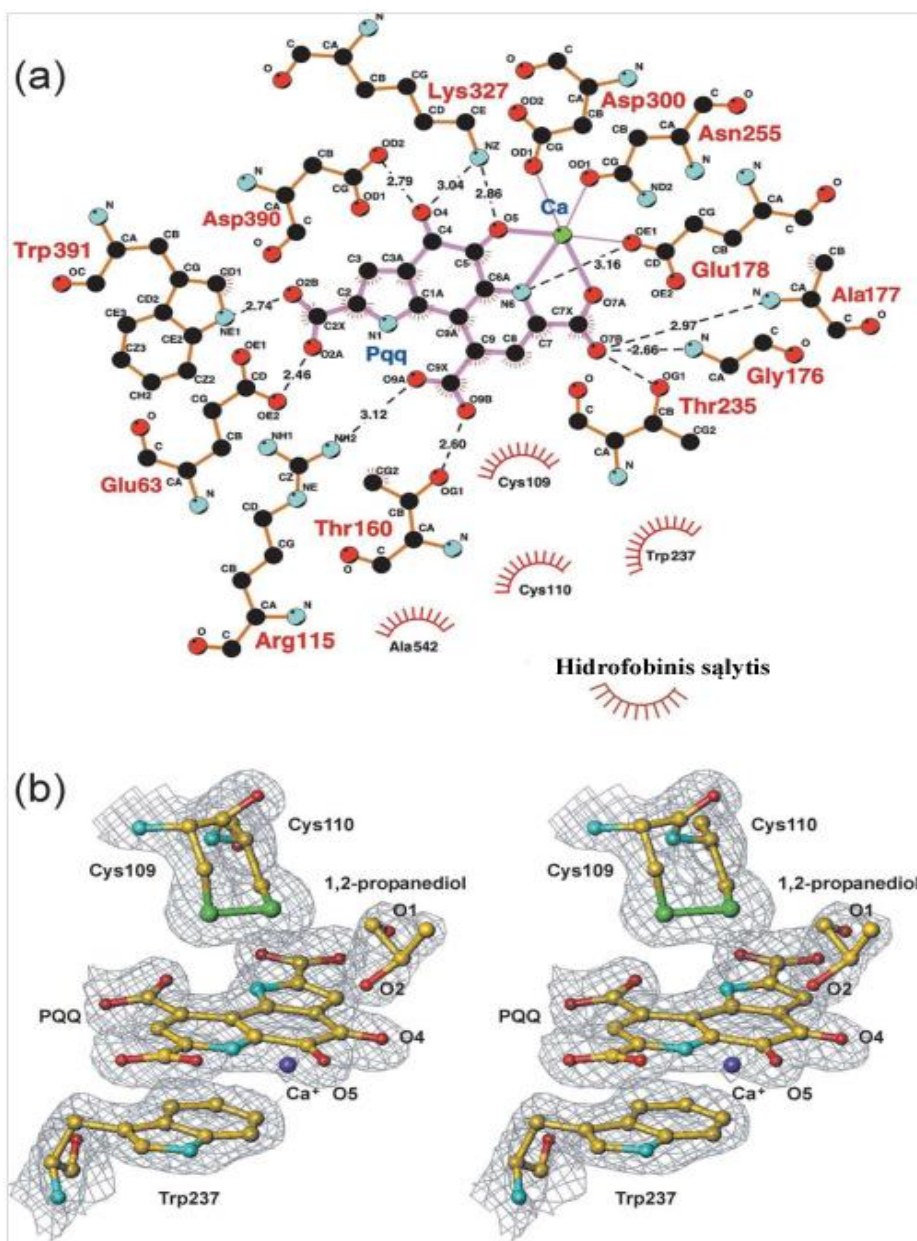


5 pav. ADH IIG PQQ domeno erdvinis vaizdas. a) Pagrindinė aštuoniukės formos mentės β propelerio struktūra parodyta lygiagrečiai su pseudo 8 kartų simetrijos ašies centre nugriežta geltona spalva ir PQQ, Ca^{2+} ir 1,2-propandiolio ligandai nupiešti rutuliukų pavidalo su prikabinta anglimi, pažymėta juoda spalva, azotu - žydra spalva, o deguonimi – raudona. 8 W motyvai, sudaryti iš keturių vijų β lakštų pažymėti W1-W8. Keturi didelės antra ir tarp propelerio kilpos, kurios išsitiesę toliau nuo propelerio struktūros, L1 (202–234 liekanos), L2 (349–387 liekanos), L3 (409–453 liekanos) ir L4 (540–559 liekanos) pažymėtos mėlyna, violetine, raudona ir žalia spalvomis atitinkamai. b) ADH IIG (žalia), ADH IIB (raudona) ir qhEDH (mėlyna) β propelerio struktūros palyginimas. ADH IIG struktūra parodyta geltona spalva. PQQ, Ca^{2+} ir 1,2-propandiolio ligandai nupiešti rutuliukų pavidalo kaip ir 5a pav. Šeši segmentai, rodantys didesnę nuokrypį tarp struktūrų ir kurie gali būti svarbesni substrato surišimui ir/arba sąveikai su citochromo domenu, yra pažymėti S1-S6

1.2.3.2. PQQ sujungimas ir katalizė

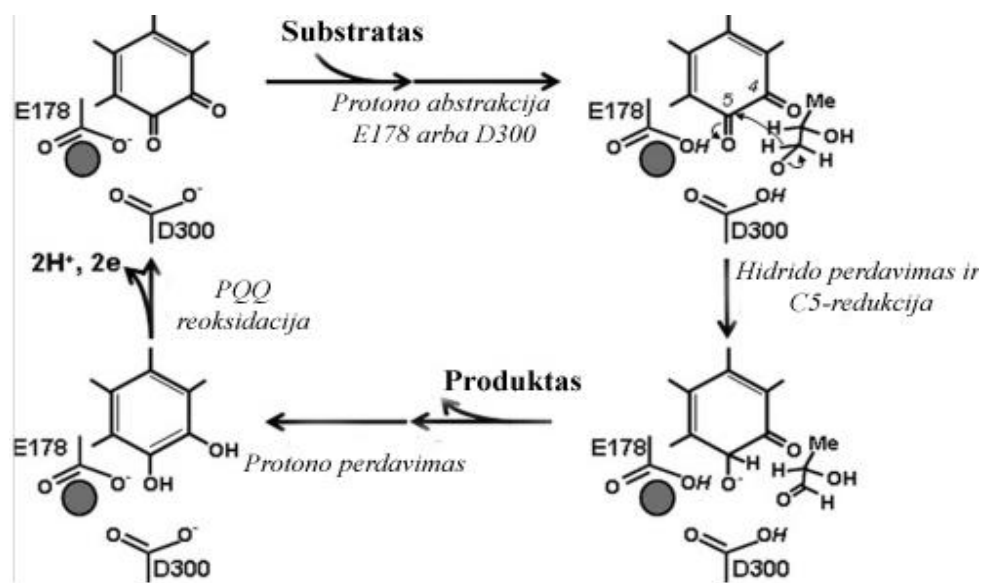
ADH IIG PQQ oksidacijos ir redukcijos kofaktorius, kaip ir visi PQQ priklausomi fermentai, surišamas su kalcio jonu per O5 ir N6 atomų žiedą ir jo O7A karboksilinis atomas, ir dvi sudedamosios dalys gali būti laikomos kaip vienas subjektas (6 pav. a). PQQ Ca dalis sąveikauja trisžiedinėje sistemos periferijoje su ADH IIG per vandenilinius ryšius ar metalą, surišant dešimties amino rūgčių šonines grandines (Glu63, Arg115, Thr160, Glu178, Thr235, Asn255, Asp300, Lys327, Asp390 ir Trp391) ir dviejų pagrindinių grandinių amino grupes (Gly176 ir Ala177). Be to, sudaro Van der Valso ryšį su disulfidiniu tilteliu, sujungiančiu Cys109 ir Cys110, esančiu žiedo viršuje, ir su Trp237, esančiu žiedo apačioje (6 pav. b). Visos šoninių grandinių sąveikos lieka tarp visų ADH ir MDH chinobaltymų, išskyrus Thr160, Thr235, Asp390 and Trp391. Asp390, kuris sudaro vandenilinį ryšį su PQQ O4 atomu, pakeičiamas Asn visiems kitiems. Thr160 ir Trp391 yra Asp ir Phe, atitinkamai, III tipe ADH, ir qEDH - Thr235 yra Ser.

Buvo nustatyta, kad MDH ir analogiškai PQQ priklausomoje tirpioje gliukozės dehidrogenazėje, alkoholių substratų oksidacija vandenilio pernašai nuo substrato C1 iki PQQ C5 sudaro bazinę katalizę protonų atskyrimo nuo substrato vandenilio grupės (7 pav.).



6 pav. ADH IIG PQQ ir kalcio ligandų aplinka. a) PQQ ir kalcio baltymų aplinkos schema.

Vandenilinio ryšio atstumas yra nurodytas Å°. Liekanos, sudarančios PQQ vandenilinius ryšius, nurodytos kaip parodyta apatiniame dešiniame kampe. Kovalentiniai ir koordinaciniai ryšiai, PQQ Ca, yra pažymėti stora rožine linija, o visos kitos jungtys nubrėžtos su plona rožine linija. b) 2Fo-Fc elektronų tankio erdvinis vaizdas, paskaičiuotas 2.2 Å° rezoliucijos. Anglies atomai parodyti kaip geltoni, azoto – žalsvai mėlini, deguonies – raudoni, sieros – žali ir kalcio- rožiniai rutuliukai. PQQ yra tarp triptofano šoninės grandinės, Trp 237 ir kaimyninės disulfidinės grupės, Cys109–Cys110. 1,2-propandiolis taip pat yra surištas aktyviame centre

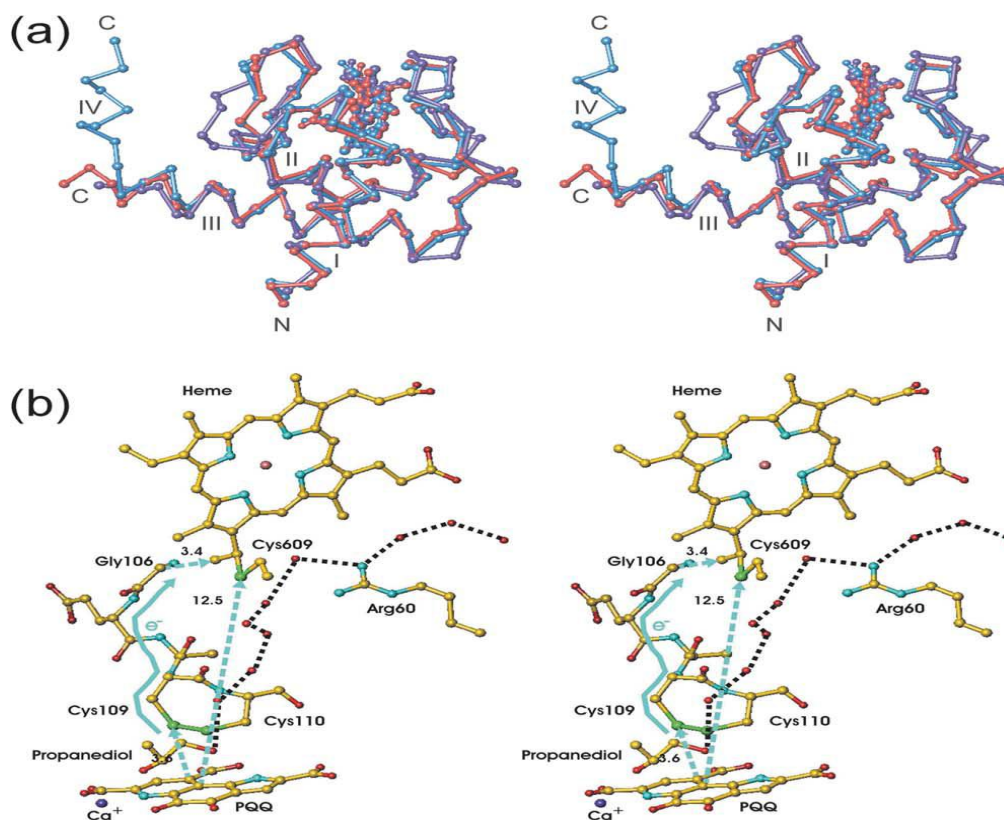


7 pav. Vandenilio pernašos mechanizmas alkoholio substratų oksidacijos PQQ/ Ca^{2+} ADH IIG aktyvaus centro. Kalcio jonai parodyti kaip pilki rutuliukai. Substrato vandenilio grupės protonas išskirtas E178 arba D300

1.2.3.3. Citochromo c domenas

Citochromo c domenas (8 pav., a) sudaro c-tipo hemo grupę, kuri kovalentiškai surišta tioeterio ryšiu per dvi Cys606 ir Cys609 Sg atomų vinilines grupes. Geležies atomo hemas koordinuotas His610 Nd atome ir Met647 Sg atome (Toyama 2005). Citochromo domenas pagrįdė sudarytas iš trijų α -spiralių. Pirma yra apie penkių apsisukimų ilgio ir tęsiasi per išsaugotą CXXCH citochromo motyvą. Antroji α spiralė apie keturių apsisukimų ilgio, išsidėsčiusi tarp histidino ir metionino geležies ligandų (Chen 2002). Trečioji α spiralė yra beveik šešių apsisukimų ilgio ir prasideda devynios liekanos po metionino ligando. Pirma ir trečia α spiralės supakuotos viena kitos atžvilgiu 80° kampu. Citochromo domenas ADH IIG turi šešias 3_{10} spiralės liekanas, esančias C gale. Tarp šių dviejų spiralių yra viena vandenilinės jungties sąveika ir keletas Van der Valso jungčių, kurie gali padėti stabilizuoti šių kompleksų struktūrą (Toyama 2005).

Citochromo domeno ADH IIG struktūra yra panaši į kitus c-tipo citochromus, ypač į ADH IIB ir qhEDH citochromo domenų (Chen 2002).



8 pav. ADH IIG struktūrinių ypatybių erdvinis vaizdas. A) ADH IIG (mėlyna), ADH IIB (raudona) ir qhEDH (violetinė) citochromo c domenų Ca dalies superpozicija. Keturios ADH IIG spirалės pažymėtos I-IV (I - Thr592-His610, II - Thr627-Phe639, III - Pro656-Glu676, IV - Asp679-683). b) PQQ, hemo grupės ir tarpinių liekanų santykinė padėtis bei kryptis, rodo galimus elektronų pernašos kelius ir protonų pristatymo kelius nuo aktyvaus centro iki heminės grupės ir išorinės aplinkos. Juodomis punktyrinėmis linijomis pažymėti vandeniliniai ryšiai, sujungiantys šešias tirpiklio neprieinančias molekules nuo substrato prijungimo iki Arg60 šoninės grandinės tris vandens molekules nuo Arg60 iki masinio tirpiklio

1.2.4. Intramolekulinis elektronų perdavimas ir protono atlaisvinimas ADH IIG

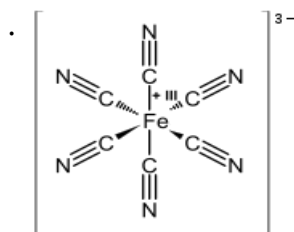
Hemas pakrypęs apie 80° (70° į ADH-IIB ir 65° į qhEDH) į PQQ. PQQ C1 yra nutolęs apie $12.5 \text{ \AA}$ ($13 \text{ \AA}$ - ADH-IIB) nuo Cys609 SG, kuris kovalentiškai jungiasi prie hemo. Šios dvi grupės yra susijungusios penkių amino rūgščių liekanų kovalentiniu ryšiu, 106–110 liekanos, kuris gali suteikti kelią elektronų srautui tarp dviejų prostetinių grupių (8 pav., b). Kelią sudaro $3.6 \text{ \AA}$ perėjimas nuo PQQ iki Cys109-Cys110 kaimyninio disulfido, toliau judama nuo Cys109 iki Gly106 ir per $3.4 \text{ \AA}$ iki

Cys609, kuris yra vienas iš hemo kovalentinių prijungimo centrų. Egzistuoja šešių vandens molekulių ADH IIG grandinė, surišta vandenilniais ryšiais, kuri uždaryta vamzdinyuose kaip ertmė, kuri veikia lygiagrečiai su Cys109–Gly106. Ši grandinė sujungia 1,2-propandiolo O1 Arg60 šoninei grandinei (8 pav., b). Tris papildomos vandens molekulės suriša tą pačią Arg60 šoninės grandinės atomą į masinį tirpiklį. Ši vandens molekulių grandinė gali suteikti protono perdavimą protonų poros atlaisvinimui nuo aktyvaus centro, kuris gaunamas alkoholio substrato oksidacijos metu.

1.3. Mediatoriai

1.3.1. Fericianidas

Fericianidas (FERY) yra anijonas $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, kurio sisteminis pavadinimas yra heksacianidoferatas (III). Senesnėje nomenklatūroje sutinkamas šios druskos pavadinimas yra heksacianoferatas (III). Dažniausia sutinkama šio anijono druska yra kalio fericianidas, raudona kristalinė medžiaga, sudaryta iš dvigubo kalio cianido ir trivalentės geležies, kuri naudojama organinėje chemijoje kaip oksidantas (Fericianidas 2012). Kalio heksacianoferatas (III) yra vienas iš dažniausiai bioteknologijose naudojamų neorganinių mediatorių (Dubinin *et al.* 1991).

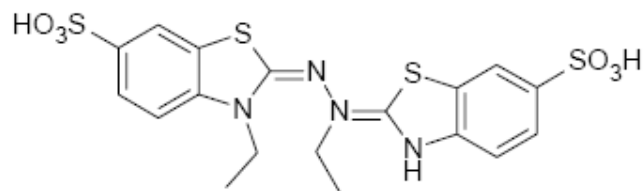


9 pav. Fericianido struktūrinė formulė

Geležis yra lengvai redukuojama iki ferocianido jono $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, kuris yra geležies (Fe^{2+}) išvestinė. Ši redokso pora yra grįžtama ir nėra susijusi su Fe-C ryšio priėmimu arba nutraukimu (Fericianidas 2012).

1.3.2. ABTS

2,2'-azino-bis-3-etilbenztiazolino-6-sulfininė rūgštis (ABTS) - biochemijoje dažnai naudojama kaip substratas įvairių oksidoreduktazių katalizuojamose reakcijose, imunofermentiniuose ELISA tyrimuose. Dažniausiai šis reagentas naudojamas peroksidazių bei lakazių katalizuojamose reakcijose. Oksiduojant ABTS susidaro žalios spalvos produktas. Jo sugerties spektras turi maksimumą ties 340 nm, o oksiduota forma turi maksimumus ties 414 ir 650 nm

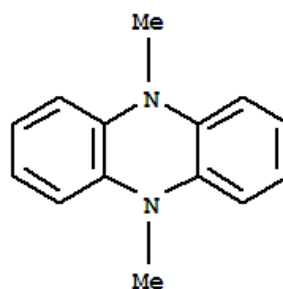


10 pav. ABTS struktūrinė formulė (Riva 2006)

ABTS gali būti naudojamas ne tik kaip substratas, bet ir kaip mediatorius. Reakcijose lakazės specifiskumą padidina elektronų pernešėjai – mediatoriai. Gamtoje yra daug junginių, kuriuos lakazė gali oksiduoti netiesiogiai naudodami mediatorius. Dažnai naudojami mediatoriai yra ABTS, HBT, TEMPO, violurinė rūgštis ir kiti (Ohanes *et al.* 2000). Įvairiose cheminėse reakcijose sutinkamas ABTS katijon-radikalas. Šis katijon-radikalas yra mėlynos spalvos. Jis gali būti naudojamas vandeninio ferato (Fe (VI)) koncentracijų nustatymui (Lee *et al.* 2005). Nustatyta, kad ABTS katijon-radikalas turi stiprias antioksidacines savybes. Lakazė, kaip lignolitinis fermentas, negali sąveikauti su substratu tiesiogiai ankstyvose augalo ląstelės sienelės irimo stadijose, nes sienelė yra pralaidi riboto dydžio molekulėms. Čia ir pasitarnauja šie junginiai – natūralūs mediatoriai. Lakazė, atsižvelgiant į jos vidutinę oksidacijos potencialą, gali oksiduoti fenolinius junginius. Nefenolinius junginius galima oksiduoti naudojant ABTS kaip mediatorių (Brancshi *et al.* 2005).

1.3.3. DHDMP

5,10-dihidro-5,10-dimetilfenazinas (DHDMP) yra žalios spalvos katijon-radikalas. Jo sugerties spektras turi maksimumą ties 462 nm bangos ilgiu.



11 pav. DHDMP struktūrinė formulė (5,10-dihidro-5,10-dimetilfenazinas 2012)

1.4. Alkoholiai

Alkoholis – organinis junginys, turintis hidroksilo grupę (-OH) susijungusią su alkilo arba alkilinės grupės anglies atomu. Pagal tokių grupių skaičių skirstomi į vienhidroksilius, dvihidroksilius, trihidroksilius ir daugiahidroksilius. Paprasčiausias šios klasės atstovas metanolis: (CH₃OH).

Alkoholiai yra klasifikuojami į pirminius antrinius ir tretinius pagal tai, prie kiek anglių yra prisijungęs C-OH anglies atomas. Pavyzdžiui: Pirminiai: metanolis (CH₃OH); etanolis (CH₃CH₂OH); 1-propanolis (CH₃CH₂CH₂OH); 1-butanolis (CH₃CH₂CH₂CH₂OH). Antriniai: 2-propanolis ((CH₃)₂CHOH); 2-butanolis. Tretiniai: 2-metil-2-propanolis ((CH₃)₃COH). Taip pat alkoholiai skirstomi į aromatinius (OH – grupė jungiasi prie benzeno žiedo) (Alkoholiai 2012).

Vienhidroksiliniai:

- Pirminiai alkoholiai:

Etanolis

Etanolis, žinomas kaip etilo alkoholis, yra alkoholis, kuris randamas alkoholiniuose gėrimuose.

Etilo alkoholis yra etanolio klasės junginys (C₂H₆O arba C₂H₅OH), turintis du anglies atomus ir kurio molekulinė masė yra 46.07 g/mol.

Etanolis yra bespalvis, lakus, skaidrus, lengvai užsidegantis savito kvapo ir deginančio skonio skystis. Gerai maišosi su vandeniu, acetonu, gliceroliu. Grynas bevandenis etanolis vadinamas absoliutiniu alkoholiu.



12 pav. Etanolio molekulės struktūra (Etanolis 2012)

Etanolis gaunamas iš mielių (ypač *Sacharomyces* genties) rauginamų medžiagų, kuriose yra angliavandenių (krakmolo, cukraus), taip pat iš hidrolizuojamos medienos, hidratuojamo etileno. Nustatyta, kad etanolis gaminasi glikolizės reakcijos metu anaerobinėmis sąlygomis, dalyvaujant įvairiems fermentams. Iš etilo alkoholio gaminami alkoholiniai gėrimai (Chastain 2006). Medicinoje vartojamas 95%, 70% ir 40% etilo alkoholis. Alkoholiniuose gėrimuose ši koncentracija labai įvairi. Naudojamas maisto pramonėje (kaip maisto priedo E numeris – E1510), farmacijoje, medicinoje (Etanolis 2012).

1-oktanolis

1-oktanolis - turi molekulinę formulę $C_8H_{18}O$, tiesios grandinės riebalų alkoholį su aštuoniais anglies atomais, nesimaišo vandenyje. Natūraliai būna kai kurių eterinių aliejų esterių pavidalo. Jo molekulinė masė 130.23 g/mol (Bushara *et al.* 2004).

Oktanolis gaminamas pramoninėje etileno oligomerizacijos būdu, naudojant trietilaliuminiu, einančiu po alkilaliuminio produktų oksidacijos.

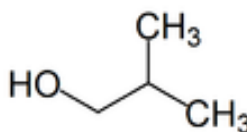


13 pav. 1-oktanolio molekulės struktūra (Oktanolis 2012)

Pagrindinis oktanolio panaudojimas yra įvairių esterių, pavyzdžiui, oktilo acetatas, kuris naudojamas parfumerijos ir aromatinių medžiagų gamyboje, taip pat naudojamas eksperimentinėje medicinoje, panaudojant oktanolį kontroliuoti nenumatytą neurologinį drebinimą (Bushara *et al.* 2004).

Izobutanolis

Izobutanolis (dar žinomas kaip izobutilo alkoholis) – bespalvis, degus skystis, turintis specifinį kvapą organinis junginys, daugiausiai naudojamas kaip tirpiklis. Jo formulė yra $C_4H_{10}O$ ir molekulinė masė 74.12 g/mol. Izobutanolis gaminamas iš propileno karbonilimo, gali būti gaunamas natūralios angliavandenių fermentacijos metu, bei kaip šalutinis produktas organinių medžiagų skilimo proceso metu (Atsumi *et al.* 2009).



14 pav. Izobutanolio molekulės struktūra (Izobutanolis 2012)

Izobutanolis turi daugybę techninių ir pramoninių pritaikymų. Naudojamas lako ir panašių dangų gamyboje, maisto pramonėje kaip kvapiosios medžiagos žaliava, kaip dažų tirpiklis ir priedas, norint sumažinti klampumą, judanti fazė plonasluoksnėje chromatografijoje. Gali tarnauti kaip alternatyva benzinui, degalų degimo varikliams ir kt. (Atsumi *et al.* 2009).

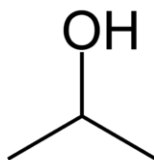
- Antriniai alkoholiai

2-propanolis

2-propanolis - (taip pat izopropilo alkoholis, propan-2-olis, izopropanolis, medicininis spiritas) - bespalvis, degus cheminis junginys su stipriu aromatu. Cheminė formulė C_3H_7OH ir molekulinė masė

60.1 g/mol. Egzistuoja izopropanolio izomeras – 1-propanolis. Priklauso trečiajai pavojingumo klasei (vidutiniškai pavojingos medžiagos) priklausomai nuo poveikio organizmui laipsnio, turi narkotinį poveikį. Reaguoja su stipriais oksidatoriais.

Izopropanolis tirpsta acetone, labai gerai tirpsta benzene, su kitais tirpikliais (vanduo, organiniai tirpikliai) maišosi bet koku santykiu.



15 pav. 2-propanolio molekulės struktūra (2-propanolis 2012)

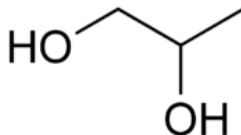
2-propanolis pramonėje gaunamas acetono hidrinimo ir propileno hidrotacijos būdais.

Plačiai naudojamas kaip techninis spirtas, pavyzdžiui, stiklo valikliuose ir pramonėje kaip tirpiklis. Izopropilo alkoholis naudojamas gauti acetoną (dehidrinimas arba dalinė oksidacija), vandenilio peroksida, metilo izobutilo ketoną, izopropilacetatą, izopropilaminą. Jis įeina į kosmetikos, kvapų, buitinės chemijos, dezinfekcinių priemonių, motorinių transporto priemonių (antifrizas) sudėtį. Izopropilo alkoholis naudojamas pramonėje aliuminio pjovime, tekinimo, frezavimo ir kitose darbuose. Mišinyje su aliejumi žymiai padidina darbo produktyvumą (Logsdon *et al.* 2000).

Dvihidroksiliniai

1,2-propandiolis

1,2-propandiolis (propilenglikolis) - organinis junginys, kurio formulė $C_3H_8O_2$ ir molekulinė masė 76.09 g/mol. Tai tirpus, bespalvis, beveik bekvapis, skaidrus, klampus skystis, silpnai saldaus skonio, turi žemą lakumą, aukštą virimo temperatūrą bei maišosi su vandeniu, acetonu ir chloroformu. 1,2-propandiolis turi asimetrišką anglies atomą, todėl egzistuoja dvejose stereioizomeriniuose formose. Komercinis produktas yra raceminis mišinys. Grynai optiniai izomerai gali būti gauti optiškai švaraus propileno oksido hidratacijos būdu. Pramoniniu būdu, 1,2-propandiolis gaunamas iš propileno oksido.

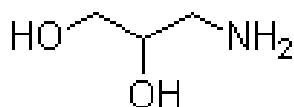


16 pav. 1,2-propandiolio molekulės struktūra

Šis organinis junginys naudojamas kaip tirpiklis maisto dažikliams ir kvapiosioms medžiagoms, poliesterių junginių gaminime, sudedamoji dalis masažo aliejuje, kaip tirpiklis daugelyje farmaciniuose priemonėse, kaip drėkikliai vaistiniuose preparatuose, kosmetikoje, maisto produktuose, šampūnuose, dantų pastose, plaukų priežiūros ir tabako gaminiuose, kaip maisto priedų drėkikliai, pažymėtų kaip E 1520, kaip tirpiklis naudojamas maišant fotografines medžiagas, pavyzdžiui, filmų kūrėjams, kaip drėkiklis, naudojamas nustatyti džiovinimo laiką dažuose ir gruntuose, kaip šaldymo agentas aušinimo skysčių sistemose ir kt. (1,2-propandiolis 2012).

3-amino-1,2-propandiolis

3-amino-1,2-propandiolis - organinis junginys, kurio formulė $C_3H_9NO_2$ ir molekulinė masė 91.11 g/mol. Tirpus vandenyje junginys.

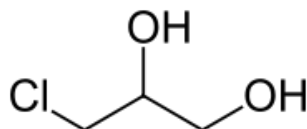


17 pav. 3-amino-1,2-propandiolio molekulės struktūra

Amino alkoholiai yra labai naudingos medžiagos įvairiam panaudojimui. Jie naudojami įvairiems sintezės tarpiniams produktams. Amino alkoholiai naudojami kaip katalizatoriai. Jų druskos, panašios ne tik į hidrochlorido druskas, tačiau ir nitratus, sulfatus, fosfatus ir sulfonato druskas gali būti naudojamos atskirai arba kartu su kitais katalizatoriais subalansuotam gydymo veiksmui su išrinktu tekstilės polimeru. Korozijos inhibicija plačiai naudojama paruošiant vandenyje tirpius katijoninius flokulantus ir jonų mainų polimerus, kurios adsorbuoja kietas ir koloidines daleles elektrostatiniais traukoms. Jie naudojami vandens valymui, metalo apdorojimui ir CO_2 dujų įsisavinimui. Biologijos srityje, amino alkoholio struktūra plačiai randama daugeliuose vaistiniuose preparatuose, ypač antihistaminuose. Amino alkoholio junginiai yra žaliavos β -laktaminių antibiotikų paruošime, maisto produktų ir kosmetikos, skonio drėkikliai, taip pat daugelio geriamųjų, injekcijų ir vaistinių preparatų. Amino alkoholiai yra amino buferiniai tirpalai, naudojami įvairiuose vaistiniuose preparatuose (3-amino-1,2-propandiolis 2012).

3-chloro-1,2-propandiolis

3-chloro-1,2-propandiolis (dar žinomas kaip 3-MCPD arba 3-monochloropropan-1,2-diolis) – organinis cheminis junginys, kancerogeninis. Jo formulė yra $C_3H_7ClO_2$ ir molekulinė masė 110.54 g/mol. Tirpus vandenyje, skaidrus, bespalvis, šviesiai geltonos spalvos skystis.

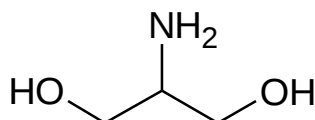


18 pav. 3-chloro-1,2-propandiolio molekulės struktūra

Naudojamas kuriant kitas chemines medžiagas, kaip tarpininkas paruošiant vaistinius ir kitus junginius (pavyzdžiui, esteriai ir aminorai) (3-chloro-1,2-propandiolis 2012).

2-amino-1,3-propandiolis

2-amino-1,3-propandiolis (sinonimas – serinolis) – turi molekulinę formulę $C_3H_9NO_2$, priklauso amino alkoholių grupei. Jis yra stabilus, higroskopinis ir labai greitai tirpsta vandenyje. Ji turi molekulinę masę 91.11 g/mol, lydosi prie 52 to 56 °C temperatūros., o virimo temperatūra yra 115 to 116 °C (Andreeben 2011).

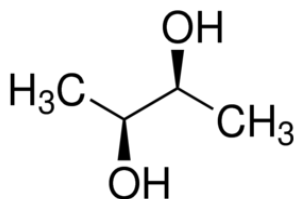


19 pav. 2-amino-1,3-propandiolio molekulės struktūra (2-amino-1,3-propandiolis 2012)

Serinolis dažniausiai naudojamas kaip tarpininkas keliose cheminėse sistemose. Daugelyje organizmų, labiausiai eukariotuose, serinolio dariniai veikia kaip centriniai antriniai tarpininkai. Serinolis, kaip ir kiti aminoalkoholiai, plačiai naudojamas medicinoje ir chemijos pramonėje. Heralinis fenilserinolis yra tarpinis pramoninių chlorafenikolių gamyboje ir aromatiniai L-serinolio dariniai yra svarbūs tarpiniai epinofrino ir norepinefrino sintezei. Be to serinolis yra vaistų pirmtakas, susijusių su skausmo gydymu (Andreeben 2011).

(2S,3S)-(+)-2,3-butandiolis

(2S,3S)-(+)-2,3-butandiolis – bespalvis, skaidrus, klampus skystis, tirpus vandenyje. Cheminė formulė $C_4H_{10}O_2$ ir molekulinė masė 90.12 g/mol.

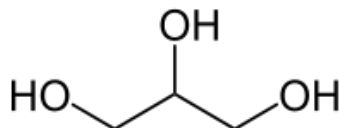


20 pav. (2S,3S)-(+)-2,3-butandiolio molekulės struktūra (2S,3S)-(+)-2,3-butandiolis 2012)

Trihidroksiliai

Glicerolis

Glicerolis (dar žinomas kaip glicerinas arba 1,2,3-propantriolis) – paprastas poliolio junginys, kurio formulė $C_3H_8O_3$ ir molekulinė masė 92.09 g/mol. Glicerolis – tirštas, bespalvis, bekvapis, tąsus skystis, tirpus vandenyje, higroskopiškas, saldoko skonio, mažai kenksmingas.



21 pav. Glicerolio molekulės struktūra

Glicerolis gaunamas kaip antrinis produktas esterinimo reakcijos metu gaminant biodyzeliną.

Šis junginys naudojamas maisto pramonėje kaip saldiklis, tabako gamyboje, medicinoje, skalbimo, kosmetikos priemonėms, tekstilės, popieriaus, plastmasės, lakų ir odos produkcijai, žemės ūkyje, elektrotechnikoje, radiotechnikoje.

Glicerolis yra naudojamas maisto pramonėje kaip saldiklis, tirpiklis, drėkiklis ir kitų maisto produktų konservavimo priemonė. Kulinarijoje glicerolis naudojamas kaip maisto priedas konsistencijos pagerinimui konditeriniams gaminiams, kepamos duonos apimties padidinimui. Glicerolis lėtina duonos gaminių žiedėjimą, makaronai tampa mažiau lipnūs. Taip pat naudojamas gaminti mono-ir di-gliceridus, skirtus naudoti kaip emulsiklius, taip pat poliglicerolio esterius įeinančius į kepimo aliejų ir margariną. Glicerolis plačiai naudojamas gaiviųjų gėrimų gamyboje.

Kaip maisto priedas, glicerolis, yra ženklinamas kaip E numeris E422.

Naudojamas arbatos, kavos ekstraktų, o taip pat nealkoholinių gėrimų gamyboje.

Glicerolis randamas alergenų imunoterapijoje, kosulio sirupuose, eliksyruose ir atsikosėjimą lengvinančiuose vaistuose, dantų pastose, burnos skalavimo skysčiuose, odos priežiūros produktuose, skutimosi kremuose, plaukų priežiūros gaminiuose, muilo ir vandens pagrįstuose asmenų tepaluose. Glicerolis yra glicerino muilo komponentas, kuris yra pagamintas iš denatūruoto alkoholio, glicerolio, natrio kastorato (iš ricinos), natrio kokoato, natrio talovato, sacharozės ir vandens.

Lokaliai grynas arba beveik grynas glicerolis veiksmingas gydymas psoriazei, nudegimui, kandai, įpjovimui, išbėrimui, pragulai ir nuospaudui.

Medicinoje ir farmacijos preparatų gamyboje glicerolis yra naudojamas vaistų tirpinime. Naudojant glicerolį vietoj vandens galima pagaminti koncentruotus medicininius tirpalus. Taip pat jis

gerai tirpina jodą, bromą, fenolį, timolą, gyvsidabrio chloridą ir alkaloidus. Glicerolis taip pat turi antiseptinių savybių.

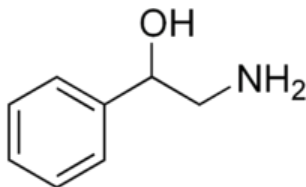
Glicerolis yra naudojamas gaminti nitrogliceriną arba glicerolio trinitratą (GTN), kuris yra pagrindinis nerūkomojo parako ir įvairių sprogmenų, pavyzdžiui, dinamito, gelignito ir raketinio kuro kaip kordito ingredientas.

Taip pat kaip kuras šildymui, kaip žaliava polimerų gamybai bei kitose pramonės šakose (Glicerolis 2012).

Aromatiniai alkoholiai

2 - amino - 1 – feniletanolis

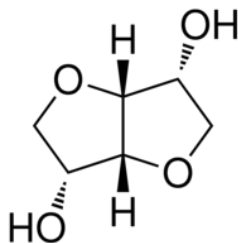
2 - amino - 1 – feniletanolis (dar vadinamas 2-hidroksifenetilaminas) – balta kieta medžiaga, kurios molekulinė formulė yra $C_8H_{11}NO$ ir molekulinė masė 137.18 g/mol.



22 pav. 2 - amino - 1 – feniletanolio molekulės struktūra (2 - amino - 1 – feniletanolis 2012)

1,4:3,6-Dianhidro-D-mannitolas

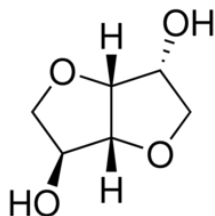
1,4:3,6-Dianhidro-D-mannitolas – kristalinės struktūros, smėlio spalvos junginys. Cheminė formulė $C_8H_{10}O_4$ ir molekulinė masė 146.14 g/mol.



23 pav. 1,4:3,6-Dianhidro-D-mannitolo molekulės struktūra (1,4:3,6-Dianhidro-D-mannitolas 2012)

Dianhidro-D-gliucitolas

Dianhidro-D-gliucitolas (sinonimai- D-Isosorbidas ir 1,4:3,6-Dianhidro-D-sorbitolas) – bespalvis, kurio lydymosi temperatūra 60-63°C. Cheminė formulė $C_8H_{10}O_4$ ir molekulinė masė 146.14 g/mol.



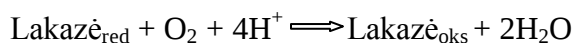
24 pav. Dianhidro-D-glucitolo molekulės struktūra (Dianhidro-D-gliucitolas 2012)

1.5. Lakazės

1.5.1. Lakazių charakteristika

Fermentų panaudojimas pramoniniam pritaikymui įvairiuose srityse pastaraisiais metais turėjo didelę svarbą. Daug tokio potencialo fermentų yra plačiai paplitę gamtoje. Lakazės yra vienos iš jų. Lakazė (benzendiol: deguonies oksidoreduktazė, EC 1.10.3.2) kelis vario atomus turintis fermentas, kuris priklauso mėlynųjų vario oksidazių grupei. Pagal Fermentų komisijos nomenklatūrą apibrėžiamos kaip oksidoreduktazės, kurios oksiduoja difenolius, taip pat kitas giminingas medžiagas ir naudoja molekulinį deguonį kaip elektronų akceptorį (Desai *et al.* 2011). Lakazė katalizuoja molekulinio deguonies redukcijos reakciją iki vandens, vykstančią kartu su substrato oksidacija (3 pav.). Šis fermentas yra plačiai paplitęs gamtoje (Hakulinen *et al.* 2002). Lakazė randama daugelyje aukštesniųjų augalų ir grybų, įskaitant medienos puvimo grybus, taip pat kai kuriose bakterijose ir vabzdžiuose (Kunamneni *et al.* 2008). Ji labiausiai yra paplitusi tarp grybų, tačiau tarp žemesniųjų grybų dar nebuvo atrasta (Kiiskinen 2004; Viswanath *et al.* 2008). Iki šiol iš grybų išgryninta ir charakterizuota daugiau kaip 100 lakazių (Kunamneni *et al.* 2008). Tipinė grybinė lakazė yra apytiksliai 60 – 70 kDa baltymas, kurio izoelektrinis taškas – apie pH 4.0 (Baldrian 2006). Lakazės pirmą kartą buvo aprašytos H. Yoshida XIX a. pabaigoje, kurios buvo išskirtos iš japonų lako medžio *Rhus vernicifer* (Riva 2006). Po kelerių metų lakazė buvo rasta ir grybuose, kuriuos aprašė G. Bertrand 1896 m. (Desai *et al.* 2011). Vėliau lakazės buvo nustatytos *Anacardiaceae* šeimoje ir *Acer pseudoplatanus*, *Pinus taeda*, *Aesculus parviflora* ir *Populus eruamericana* augalų rūšyse (Viswanath *et al.* 2008). Augaluose lakazės rastos medžiuose, kopūstuose, ropėse, obuoliuose, bulvėse, kriaušėse ir įvairiose kitose daržovėse. Jos buvo išskirtos iš *Ascomycetes*, *Deuteromycetes* ir daugiausiai iš *Basidiomycetes* grybų (Kunamneni *et al.* 2007). Basidiomycetes klasę sudaro įvairūs medieną ir kraiką ardantys, dirvožemyje gyvenantys grybai (CHO *et al.* 2008). Augalinės lakazės dalyvauja lignino sintezėje, o grybelinės lakazės lignino degradacijoje, taip pat atlieka keletą kitų funkcijų, tokių kaip pigmentacija, sporuliacija, patogeniškumas

ir detoksikacija (Hakulinen *et al.* 2002). Tik kelios iš šių funkcijų buvo įrodytos eksperimentiškai (Kunamneni *et al.* 2008). Pirmoji aptikta bakterinė lakazė buvo iš *Azospirillum lipoferu*, ji dalyvauja formuojant melaniną. Nors lakazės jau seniai žinomos, tačiau jomis labiau susidomėta tik tada, kai buvo pradėta tyrinėti fermentus, esančius medienos puvinį sukeliančiuose baltuose grybuose (Baldrian 2006).



25 pav. Tipinė lakazės katalizuojama reakcija (Fabbrini *et al.* 2002)

Skirtingai negu daugelis fermentų, kurie paprastai yra labai specifiški substratui, lakazės reaguoja su stebėtinai didele įvairove substratų, įskaitant difenolius, polifenolius, metoksi-fenolio pakaitalus, diaminus, aromatinis aminus, benzenetiolius ir netgi kai kuriais neorganiniais junginiais, tokiais kaip jodas. Substratas oksiduojamas lakazės, praranda vieną elektroną ir formuoja laisvą radikalą. Nestabilus radikalas dalyvauja tolesnėje lakazės katalizuojamoje oksidacijoje (Desai *et al.* 2011). Kai kurios lakazių savybės gali būti pritaikomos biotechnologijoje. Lakazės sugebėjimas oksidacijos metu gaminti netirpius polimerus gali būti panaudojamas sausumos ir vandens teritorijų, užterštų įvairiais teršalais, detoksikacijai (CHO *et al.* 2008)

Lakazės yra glikoproteinai, kurių molekulinė masė yra 50-130 kDa (Morozova *et al.* 2007). Augalinių lakazių angliavandenių dalis sudaro iki 45% baltymo molekulės masės, tuo metu grybinėms lakazėms charakteringas daug mažesnis angliavandenių kiekis (10-30%). Yra manoma, kad molekulės angliavandenių dalis suteikia baltymo globulei konformacinį stabilumą ir saugo fermento molekulę nuo proteolitinės degradacijos ir radikalų inaktyvacijos (Kunamneni *et al.* 2007). Lakazės priklauso polifenolio oksidazių grupei, turinčiai vario atomų katalitiniame centre ir yra dažnai vadinamos daugiavarėmis oksidazėmis (Hakulinen *et al.* 2002). Lakazės išskirtos iš įvairių šaltinių yra labai skirtingos, atsižvelgiant į jų glikozilinimo lygį, molekulinę masę ir kinetines savybes (Jordan, 2005). Šis fermentas turi keturis vario jonus, kurie skirstomi į tris tipus: T1, T2 ir T3. Pirmojo tipo varis duoda fermentui būdingą mėlyną spalvą (Kunamneni *et al.* 2008). Viena iš svarbiausių lakazės charakteristikų yra fermento T1 centro standartinis redokso potencialas. Buvo įrodyta, kad nuo T1 centro potencialo priklauso substratų oksidacijos katalitinis efektyvumas. Todėl didelio oksidacijos ir redukcijos potencialo lakazės kelia didelį susidomėjimą (Шлеев *et al.* 2003).

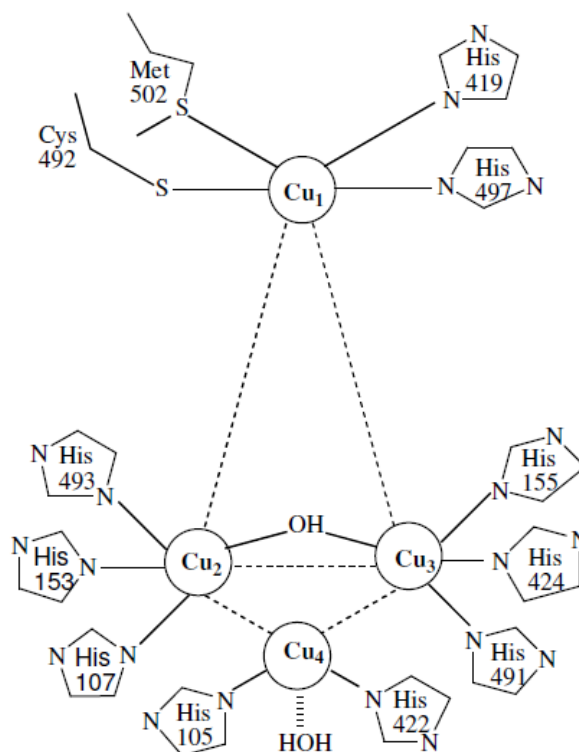
1.5.2. Lakazės aktyvaus centro struktūra

Lakazės aktyvųjų centrą sudaro keturi vario atomai, kurie yra būtini jos kataliziniam aktyvumui (Jordan 2005). Šie atomai išsidėsto viename monobranduoliniame (T1) ir viename tribranduoliniame (T2/T3) centruose. T1 vario jonas suteikia lakazių tirpalams būdingą ryškiai mėlyną spalvą. T2/T3 (tribranduolinis vario klasteris) sudaro vienas T2 ir du T3 vario jonai (Morozova *et al.* 2007). Atstumas tarp T2 ir T3 fermento centrų yra apie 4 Å, o T1 vario jonas nutolęs maždaug 12 Å nuo jų (Enguita *et al.*, 2003; Garavaglia *et al.* 2004).

Lakazės aktyvaus centro vario jonai klasifikuojami pagal jų spektrines ir EPR (elektroninis paramagnetinis rezonansas) savybes (Desai *et al.* 2011). T1 variui būdinga stipri sugertis esant 600 nm bangos ilgiui, o T2 vario sugertis matomoje srityje yra silpna. T2 centras EPR atžvilgiu yra aktyvus. Lakazės T3 centrą sudaro du vario jonai, kuriuos tarpusavyje jungia antiferomagnetinis ryšis per hidroksido tiltelį. Šie atomai pasižymi sugertimi artimoje UV spektro srityje ($\lambda \approx 330$ nm). Esant antiferomagnetiniui ryšiui, kurio tarpininkas prisijungęs ligandas, T3 centre esantys du vario jonai EPR atžvilgiu yra neaktyvūs.

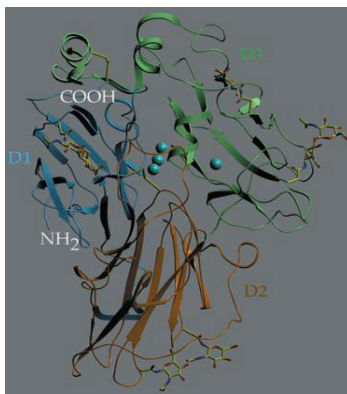
T1 centras turi keturis ligandus: du histidinus, cisteiną ir metioniną, kuris yra kintamas. Grybinė lakazė vietoje metionino turi leuciną arba fenilalaniną, kurie negali būti tiesiogiai koordinuoti su variu. Taigi T1 Cu grybinėje lakazėje yra koordinuotas tik su trimis atomais ir yra sieros bei azoto ligandų plokštumoje (4 pav.).

T2/T3 klasterį sudaro aštuoni histidino ligandai (T2 centrą sudaro du histidino ligandai, o T3 centre yra šeši histidino ligandai) (Morozova *et al.* 2007). Šie ligandai yra pavaizduoti 4 pav.



26 pav. Lakazės aktyvūs centras. Cu1 – I tipo varis, Cu4 – II tipo, Cu2 ir Cu3 – III tipo (Enguita *et al.* 2004)

5 pav. pateikta *Trametes versicolor* lakazės kristalinė struktūra, rodanti, kad lakazė yra monomerinė molekulė, kuri gali būti analizuojama kaip tipinės lakazių struktūros pavyzdys. Lakazės monomerinė struktūra sudaryta iš trijų paeiliui išsidėsčiusių domenų. Pirmą domeną sudaro dvi keturios-didelės β klostės ir keturios 3_{10} -spirālės. Jungiančiuosius segmentus sudaro keturios 3_{10} -spirālės. Trys iš jų sujungia peptidus tarp β lakštų ir viena yra segmentas tarp pirmojo ir antrojo domenų. Antrasis domenas turi vieną šešių susuktą ir vieną penkių susuktą β klostę ir panašų 1 domeną, kuriame yra 3_{10} -spirālės peptiduose jungiančiuose β suktukuose, taip pat 1 ir 3 domenų, atitinkamai. Trečias domenas turi didžiausią sraigtinį turinį su viena 3_{10} -spirale ir dvi α spirales, esančias sričių jungtyje tarp skirtingų susukimų. Lakazės *Trametes versicolor* baltymo globulės dydis yra lygus $65 \times 55 \times 45 \text{ Å}$.



27 pav. *Trametes versicolor* lakazės kristalografinė struktūra (Piontek *et al.* 2002)

1.5.3. Katalizės mechanizmas

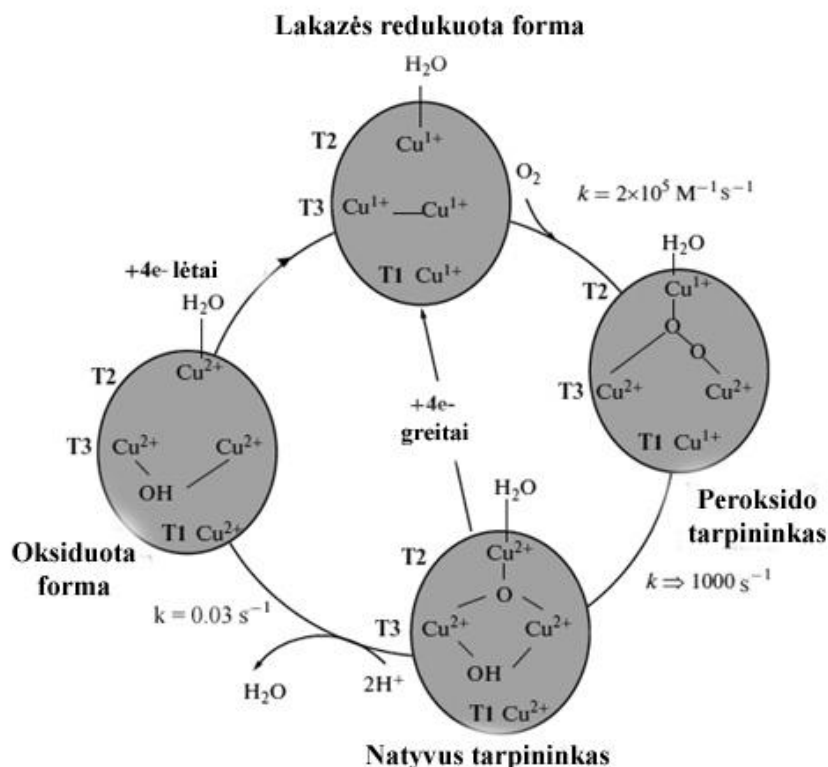
Katalizinis ciklas apima substrato elektronų donoro oksidaciją ir elektrono pernešimą ant T1 fermento centrą. Lakazės T1 centras priima elektronus iš redukuoto substrato ir tada jie pernešami ant tribranduolio T2/T3 klasterio, kur molekulinis deguonis yra aktyvuojamas ir redukuojamas iki vandens (Куликова *et al.* 2011).

Visiškai redukuota lakazė, sąveikaudama su molekulinio deguonimi, sudaro skirtingas fermento formas. Dvi gerai žinomos formos vadinamos peroksido tarpininku ir natyviu tarpininku (Quintanar *et al.* 2005). Natyvus tarpininkas vaidina svarbų vaidmenį katalitiniame lakazės cikle (6 pav.). Šio tarpininko reakcijos su deguonimi metu jis veikia kaip deguonies radikalas. EPR atveju visi keturi vario jonai natyviame tarpininke oksiduojami. Šio junginio struktūra skiriasi nuo „nieko neveikiančios“ fermento formos tuo, kad T2 vario jono centras nesusijungusi su jonu iš T3 dalies.

6 pav. parodyta deguonies molekulės keturių elektronų redukcija iki vandens dalyvaujant lakazei. Visiškai redukuotas tribranduolis T2/T3 lakazės vario klasteris sąveikauja su molekulinio deguonimi gamindamas peroksido tarpininką. Naudojant lakazę su T1 vario jonu pakeičiant gyvsidabrio Hg^{2+} jonų oksidacijos ir redukcijos inertiškumą, susidaro peroksido tiltelis tarp redukuoto T2 ir oksiduoto T3 centrų. Šis tarpininkas pasikeičia į junginį, kuris panašus į natyvų lakazės tarpininką su keturiais vario jonais aktyviame centre. Peroksidinio tarpininko (T1-Hg-lakazė) ir natyvaus tarpininko (natyvus fermentas) gamyba priklauso nuo deguonies koncentracijos, taip pat šių reakcijų greičio konstantos. Manoma, kad peroksido tarpininkas turi O_2^{2-} joną, vienas iš deguonies atomų susijungęs su T2 ir T3 vario jonais, kitas koordinuotas su kitu T3 vario jonu (Ferraroni *et al.* 2007; Morozova *et al.* 2007).

Peroksidinio O-O ryšio suskilimas virstant nuo peroksido iki natyvaus tarpininko apima protonų ir elektronų perdavimo mechanizmą, kuris nėra aiškiai detalizuotas. Šio proceso aktyvacijos energija yra ~ 9 kcal/mol, ir tai sutampa su mechanizmu, kuris apima vieno elektrono redukcijos skilimą iš peroksido.

Natyvus tarpininkas gali lėtai transformuotis į visiškai oksiduotą formą, kuri dažnai yra vadinama "nieko neveikiančia" lakazės forma. Šio fermento T1 centras gali būti redukuotas substrato, bet elektronų perdavimo greitis ant tribranduolinio vario klasterio yra per mažas, kad būtų reikšmingas katalizei.



28 pav. Lakazės katalizinis ciklas, rodantis fermento vario centro redukcijos ir oksidacijos mechanizmą (Куликова *et al.* 2011)

1.5.4. Lakazių panaudojimas

Oksidacijos reakcijos yra plačiai naudojamos pramoniniuose procesuose, pavyzdžiui: celiuliozės ir popieriaus, tekstilės, maisto, medienos apdirbimo, farmacijos ir chemijos pramonėse. Daugelis šiuo metu naudojamų oksidacijos metodų nėra ekonomiškai ir ekologiškai patenkinami, nes jie sukelia nepageidaujamas šalutines reakcijas ir oksidantai arba reakcijos katalizatoriai dažnai yra nuodingi. Oksidacija fermentais naudojama todėl, kad fermentai yra labai specifiški ir veiksmingi katalizatoriai,

taip pat ekologiškai subalansuoti. Šiuo metu lakazės yra vertinamos kaip labai įdomūs fermentai pramoninėms oksidacijos reakcijoms, nes jos sugeba oksiduoti įvairius substratus. Be to jos naudoja lengvai prieinamą molekulinį deguonį kaip elektronų akceptorį, o ne brangus kofaktorius pavyzdžiui NAD(P)^+ (Kunamneni *et al.* 2008; Kiiskinen 2004). Taigi lakazės yra naudojamos medžio lignino šalinime ir balinime, naudojant medžius ardančius grybus, pramonės gamyklų nutekamųjų vandenų apdorojime, pluošto ir dažų balinimui tekstilės ir dažų pramonėje, fenolinių junginių fermentiniame šalinime gėrimų, vaisių sulčių perdirbime ir biosensoriaus bei biokuro ląstelių konstrukcijoje.

Lakazės vaidina svarbų vaidmenį lignino degradacijoje. ABTS yra pirmasis mediatorius, kuris buvo panaudotas lakazės mediatorinėje sistemoje medžio lignino šalinime. Taip pat vienas iš efektyviausių mediatorių lignino degradacijoje yra HBT (Giardina *et al.* 2010). Lignino pašalinimas iš sumedėjusių audinių yra labai svarbus procesas, ypač pulpos ir popieriaus pramonėje. Todėl lakazės kartu su mediatoriais plačiai taikomos vykdant medžio skaidulų delignifikaciją, bei naudojamos pulpos paruošimui popieriaus pramonėje (Kunamneni *et al.* 2008; Kiiskinen 2004).

Medienos puviname dalyvaujant baltiesiems medžio šaknų grybams, lakazė yra vienas iš pagrindinių fermentų įtraukiamų į lignino degradacijos procesą. Jos įsijungia į degradacijos procesą kai medienos puvinas būna prasidėjęs. Lakazė, pavyzdžiui iš *Trametes*, gali būti ekspresuota mielėse *Saccharomyces cerevisiae*. Šios transformuotos mielės yra labai atsparios fenoliniams junginiams. Rezultatai rodo, kad lakazės iš baltųjų medžio šaknų grybų utilizuoja lignino produktus, taip pat jos yra atsparios susidarantiems fenoliniams junginiams, kurie šioje reakcijoje dalyvauja kaip inhibitoriai (Mayer *et al.* 2002).

Lakazės taip pat gali būti naudojamos sintetinti įvairius funkcinis organinius junginius, įskaitant polimerus su specialiomis mechaninėmis/elektrinėmis/optinėmis savybėmis, tekstilės dažus, kosmetikos pigmentus, aromato ir skonio agentus bei pesticidus.

Tekstilės pramonėje oksidoreduktazės buvo sėkmingai taikomos medvilnės pluošto balinime, dažų apdailos ir atliekų nuotekų valyme (Kiiskinen 2004). Azo dažai yra didžiausia dažiklių grupė, naudojama pramonėje, kuri taip pat yra žalinga. Medieną degraduojantis baltas puvinio grybas *Phanerochaete chrysosporium* yra vienintelis organizmas, galintis visiškai suskaldyti azo dažus. Buvo ištirta, kad lakazė iš *Pyricularia oryzae* taip pat sugeba oksiduoti azo dažus (Chivukula *et al.* 1995).

Daugelis lakazės substratų, pavyzdžiui angliavandeniai, nesotieji riebalų rūgštys ir fenoliai yra svarbūs komponentai įvairių maisto produktų ir gėrimų gamyboje. Lakazės gali būti naudojamos kaip O_2 sugėriklis geresniam maisto pakavimui. Naudojant lakazę gali būti pagerinta augalinių aliejų skonio

kokybė, nes lakazė gali panaikinti ištirpusį deguonį. Lakazės gali būti panaudojamos vyno skaidrinimui, taip pat siekiant padidinti alaus saugojimo laiką (Widsten *et al.* 2008).

Lakazės gali būti naudojamos cheminėje sintezėje. Pavyzdžiui, lakazės katalizuojamos reakcijos gali būti naudojamos katechino monomerų polimerizacijoje polikatecholio sintezėje arba inertinių fenolio polimerų gamyboje, pavyzdžiui, poli(1-naftolo). Lakazės buvo naudojamos sintetinant dažus ir farmacijos produktus, pavyzdžiui, antivėžinis vaistas aktinocinas arba fitoaleksinas resveratrolis.

Pastaruoju metu augantis susidomėjimas buvo sutelktas į lakazių kaip naujų biologinių katalizatorių taikymą organinėje sintezėje. Yra žinoma, kad lakazės polimerizuoja įvairius amino ir fenolio junginius. Neseniai, siekiant pagerinti kuro etanolio gamybą iš atsinaujinančių žaliavų, *T. Versicolor* lakazė buvo išreikšta *S. Cerevisiae*, norint padidinti jos atsparumą (fenolio) fermentacijos inhibitoriams lignoceliuliozės hidrolizatuose. Lakazės mediatorinė sistema buvo naudojama monokloninių antikūnų azelaino rūgšties iš oleino rūgšties nustatyme.

Daugelis lakazės sukurtų produktų yra antimikrobiniai, detoksikuojantys arba aktyvūs individualiosios priežiūros atstovai. Lakazės gali būti naudojamos sudėtingų medicinos junginių tokių, kaip anestetikai, antibiotikai, raminamieji ir kitų sintezėje.

Viena iš galimų panaudojimų yra lakazės pagrįstas *in situ* jodo susidarymas. Šis reagentas plačiai naudojamas kaip dezinfekuojanti medžiaga. Be to yra įrodyta, kad lakazė turi pakankamai įtakos ŽIV-1 atvirkštinės transkriptazės aktyvumo slopinimui. Lakazės turi teigiamą panaudojimą bioremediacijoje. Jos gali būti naudojamos įvairių medžiagų išsklaidyme, tokių kaip nepageidaujamos priemonės, šalutiniai produktai arba išmetamos medžiagos. Lakazės gali būti naudojamos nemalonių kvapų pašalinime tokiose vietose kaip šiukšlių šalinimo vietos, gyvulininkystės ūkis ir celiuliozės fabrikai.

Kitas galimas su aplinka susijęs lakazės panaudojimas yra užteršto dirvožemio bioremediacija, kaip lakazės ir jos mediatorinė sistema galinti oksiduoti toksinius organinius teršalus, pavyzdžiui įvairius ksenobiotikus, chlorfenolius ir kitus teršalus.

Nauja lakazių taikymo sritis yra kosmetikos pramonė. Pavyzdžiui, lakazės pagrįsti plaukų dažai mažiau dirgina negu šiuolaikiniai dažai. Lakazės gali būti naudojamos kaip dezodorantai asmens higienos priemonėms, įskaitant dantų pastą, burnos ploviklį, muilą ir vystykus. Lakazės baltymų inžinerija gali būti naudojama siekiant sumažinti alergiskumą (Kunamneni *et al.* 2008).

Dėl savo struktūros ir katalitinio mechanizmo lakazės yra labai įdomios tiek fundamentiniuose tyrimuose, tiek jų pritaikyme biotechnologijoje (Morozova *et al.* 2007).

2. EKSPERIMENTINĖ DALIS

2.1. Medžiagos ir metodai

2.1.1. Reagentai ir prietaisai

Darbe naudota *Pseudomonas putida* HK5 alkoholio dehidrogenazė (ADH IIG) buvo išskirta Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje. Galutinis produktas buvo liofilizuoti milteliai. Siekiant išgauti ADH IIG, bakterijos sienelė buvo auginama 1,2-propandiolyje, substate panašiam gliceroliui. Gautas galutinis produktas buvo baltyminis tirpalas, kurio specifinis aktyvumas ~9 U/mg baltymo. Molinė fermento koncentracija buvo nustatyta laikant, kad monomerinio fermento molekulinė masė lygi 72 kDa (Bachmatova *et al.* 2004). Nauja grybinė L-95 lakazė buvo išskirta Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje. Moliarinė fermento koncentracija apskaičiuota laikant, kad fermento molekulinė masė lygi 85 kDa. Rekombinantinė *Coprinus cinereus* peroksidazė (rCiP) ir *Aspergillus niger* katalazė buvo gautos iš „Novozymes A/S” (Danija). rCiP koncentracijai nustatyti buvo naudotas molinės sugerties koeficientas $1,08 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, esant 405 nm bangos ilgiui (Farhangrazi, *et al.* 1994), o katalazės koncentracijai nustatyti buvo naudotas molinės sugerties koeficientas $150 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, esant 280 nm bangos ilgiui. Dimetil sulfoksidas (DMSO, Mm 78,13) buvo gautas iš “Sigma Chemical Co” (JAV). 30% vandenilio peroksido tirpalas gautas iš „ROTH” (Vokietija). Vandenilio peroksido koncentracija nustatyta spektrofotometriškai, esant 240 nm bangos ilgiui, naudojant molinės sugerties koeficientą $39,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Nelson *et al.* 1972).

2,2'-azino-bis(3-etilobenzotiazolino-6-sulfoninė rūgštis) (ABTS, Mm 548,7) gauta iš “Boehringer Mannheim GmbH” firmos (Vokietija). Glicerolis (Mm 92,09) gautas iš firmos „ChemPur (Lietuva). Etanolis (Mm 46,07), 1-oktanolis (Mm 130,23), 1,2-propandiolis (Mm 76,09), (+/-)-3-chloro-1,2-propandiolis (Mm 110,54), (+/-)-3-amino-1,2-propandiolis (Mm 91,11), 2-amino-1,3-propandiolis (Mm 91,11), 2-amino-1-feniletanolis (Mm 137,18), 2-propanolis (Mm 60,1), (2S,3S)-(+)-2,3-butandiolis (Mm 90,12), 1,4:3,6-dianhidro-D-mannitolas (Mm 146,14) ir Dianhidro-D-gliucitolas (Mm 146,14) gauti iš „Fluka“ (Šveicarija). Izobutanolis (Mm 74,122), fericianidas (FERI, Mm 329,29) gauti iš “Reachim” (Rusija). 5,10-dihidro-5,10-dimetilfenazino (DHDMP⁺, Mm 245,5) katijon-radikalas buvo sintetintas kaip aprašyta (Kulys *et al.* 1998).

Alkoholių tirpalai buvo ruošiami vandenyje ir dimetilsulfoksido (DMSO) (1-oktanolis).

Medžiagų svėrimui buvo naudojamos analitinės svarstyklės (Lenkija).

Medžiagų dozavimui naudotos įvairių tūrių mikropipetės.

Buferinio tirpalo pH nustatymui naudotas universalus pH-metras WTW GmbH (Vokietija).

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Spektrofotometrinis metodas

2.2.1.1. Kinetiniai matavimai

Substratų oksidacijos kinetiniai tyrimai atlikti spektrofotometriškai, naudojant “Nicolet evolution 300” spektrofotometrą, 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale, pH 8.0 su 2 mM CaCl₂. Registruojamos sugerties mažėjimo kinetinės kreivės vykstant kalio fericianido, DHDMP katijon-radikalo ar ABTS katijon-radikalo redukcijai, 25 °C temperatūroje, esant ADH IIG, ir atitinkam alkoholiui. Reakcija pradedama pridedant fermento tirpalo. Oksiduoto substrato koncentracija buvo paskaičiuota pagal fericianido vartimą į ferocianidą ($\epsilon_{420} = 1.02 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Schellenberg 1958), ABTS katijon-radikalo (ABTS⁺) vartimą į ABTS ($\epsilon_{414} = 36 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Villaño *et al.* 2004), bei DHDMP katijon-radikalo ($\epsilon_{462} = 7.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Kulys *et al.* 2000) redukciją.

2.2.1.2. ABTS katijon-radikalo paruošimas

Į 50 mM Tris/HCl buferinį tirpalą pridedama 2 ml 100 μM ABTS, 50 μL vandenilio peroksido (apie 4 mM) ir 50 μL r-CiP (apie 800 nM) tirpinto vandenyje ir inkubuojama 2 minutes kambario temperatūroje. Po inkubacijos pridedama 50 μL katalazės (apie 800 nM) ir papildomai inkubuojama 1-2 min. ABTS katijon-radikalo mėlynas tirpalas matavimų metu laikomas ledo vonioje.

2.2.1.3. Kinetinių parametrų nustatymas ir konstantų skaičiavimas

Alkoholių ir mediatorių (FERI, DHDMP⁺ ir ABTS⁺) kinetiniai parametrai nustatyti, naudojant 1 mM FERI, 100 μM DHDMP⁺, 40 μM ABTS⁺ ir skirtingas alkoholių koncentracijas, arba su 10–30 mM alkoholių ir skirtingomis mediatorių koncentracijomis, atitinkamai. Skirtingų substratų oksidacijos pradiniai reakcijos greičiai (V_0) skaičiuoti aproksimuojant kinetines kreives taikant tiesės lygtį, kur tiesės nuolinkio kampo tangentas (*slope*) yra pradinis reakcijos greitis.

Pradinių reakcijų greičių priklausomybių nuo substratų koncentracijų analizei ir tariamųjų kinetinių parametrų V_{max} ir K_M nustatymui taikyta Michaelio-Menten lygtis. Katalitinė konstanta buvo skaičiuojama kaip V_{max} ir fermento koncentracijos santykis ($V_{\text{max}}/[E]$). Fermento ir substratų reaktingumo konstantos (k_{ox} ir k_{red}) skaičiuota kaip katalitinės konstantos ($V_{\text{max}}/[E]$) ir K_M santykis ($V_{\text{max}}/\{[E] \cdot K_M\}$).

2.2.1.4. pH priklausomybės tyrimai

Fermento aktyvumo nuo pH priklausomybė tirta, naudojant 50 mM Tris-HCl buferinį tirpalą, esant 2 mM CaCl_2 (pH 5.5–9.5) ir 50 mM fosfat-citratinį buferinį tirpalą, esant 2 mM CaCl_2 (pH 3.5–9.5). Buferinio tirpalo pH buvo keičiama nuo 3.5 iki 9.5 pH intervale. pH reikšmė, kuriai esant pasiekiamas didžiausias pradinis reakcijos greitis, vadinamas optimalia pH reikšme.

2.2.2. Deguoninis metodas

Glicerolio ir 1,2-propandiolio oksidacinių virsmų katalizuojamų lakazės ir alkoholio dehidrogenazės tyrimai atlikti naudojant membraninį deguoninį elektrodą ir 1,1 ml tūrio gardelę. Matavimai atlikti 50 mM Tris/HCl buferiniame tirpale, pH 8.0, kambario temperatūroje. Priimta, kad deguonies koncentracija oru prisotintame 0,1 M buferiniame tirpale 25°C temperatūroje lygi 0,25 mM.

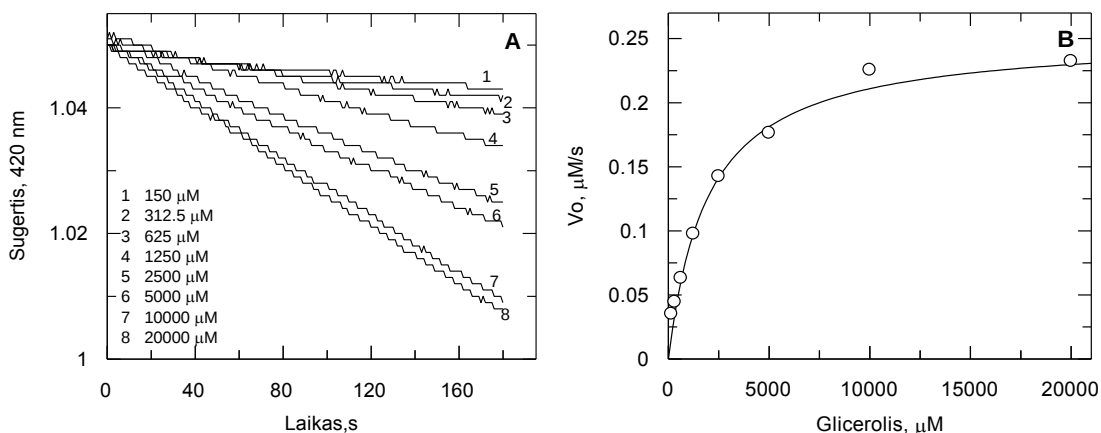
Naudojant deguoninį elektrodą buvo registruojamas srovės kitimas reakcijos metu. Gautos srovės kitimo laike kreivės, perskaičiuotos į deguonies sunaudojimo kinetines kreives, priimant, kad deguonies soties koncentracija lygi 0,253 mM. Pradinis reakcijos greitis skaičiuotas iš duomenų gautų deguoniniu elektrodu iš deguonies sunaudojimo kreivių. Gautos kinetinės kreivės aproksimuotos taikant tiesės lygtį ir gaunamas pradinis deguonies sunaudojimo greitis. Tiesės lygties nuolinkio kampo tangentas (*slope*) ir yra pradinis reakcijos greitis. Jo reikšmės atitinka deguonies, esančio gardelėje, sunaudojimo greitį ($\mu\text{M/s}$).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. ADH IIG alkoholio dehidrogenazės substratinio specifiškumo alkoholiams tyrimas

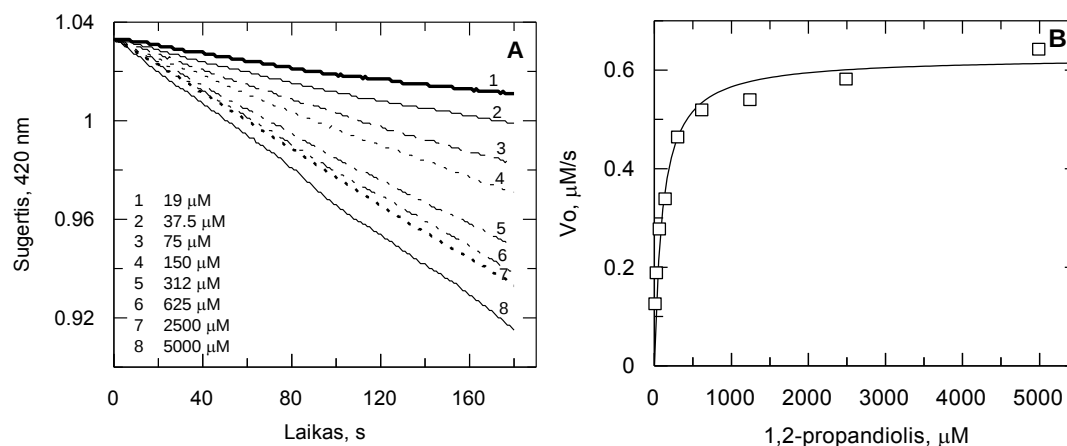
3.1.1. ADH IIG reakingumo su įvairiais alkoholiais tyrimas

Tiriant substratinę ADH IIG specifiškumą, buvo registruojamas fericianido sugerties mažėjimas, esant skirtingoms alkoholių koncentracijoms. Gautos sugerties kitimo kreivės laike, esant skirtingoms glicerolio (29 pav., A) ir 1,2-propandiolio (30 pav., A) koncentracijoms, iš kurių paskaičiuoti pradiniai reakcijų greičiai aproksimuojant kinetines kreives tiesės lygtimi ir gautos pradinio reakcijos greičių (V_0) priklausomybės nuo alkoholių koncentracijų.



29 pav. FERI sugerties mažėjimo kinetinės kreivės, esant skirtingoms glicerolio koncentracijoms (A) bei pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos, reakciją katalizuojant ADH IIG (B). Eksperimento sąlygos: (A-B) - 50 mM Tris/HCl buferinis tirpalas pH 8,0; 25 °C; 1 mM FERI, 150 - 20000 μM glicerolio, 56 nM ADH IIG

Tiriant pradinio reakcijos greičio priklausomybę nuo glicerolio (29 pav., B) ir 1,2-propandiolio (30 pav., B) koncentracijų, gauta, kad didinant substrato koncentraciją reakcijos greitis didėja hiperboliškai. Gautos kreivės aprašytos Michaelio-Menten lygtimi, kurią panaudojus nustatytos tariamosios K_M bei $V_{\max}$ reikšmės, bei apskaičiuotos oksidacijos ir katalitinės konstantos, kurios pateiktos 2 lentelėje.



30 pav. FERI sugerties mažėjimo kinetinės kreivės, esant skirtingoms 1,2-propandiolio koncentracijoms (A) bei pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo 1,2-propandiolio koncentracijos, reakciją katalizuojant ADH IIG alkoholio dehidrogenaze (B). Eksperimento sąlygos: (A-B) - 19 - 10000 μM 1,2-propandiolio, kitos sąlygos kaip 29 pav.

Tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip glicerolio ir 1,2-propandiolio atvejais, tirta kitų alkoholių oksidacija katalizuojama ADH IIG alkoholio dehidrogenaze ir gauti parametrai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. Alkoholių oksidacijos, katalizuojamos ADH IIG, naudojant kaip mediatorių FERI, kinetiniai parametrai. Sąlygos: 50 mM Tris/HCl buferinis tirpalas pH 8,0; 25 °C; 1 mM FERI

Alkoholiai	$K_M, \mu\text{M}$	$V_{\max}, \mu\text{M/s}$	$k_{\text{red}}, \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{kat}}, \text{s}^{-1}$
Glicerolis	2535 $\pm$ 435	0.25 $\pm$ 0.001	0.013 $\pm$ 0.005	33.3 $\pm$ 1.9
Etanolis	30680 $\pm$ 5800	0.57 $\pm$ 0.03	0.0003 $\pm$ 0.00005	10.2 $\pm$ 0.5
1-oktanolis	528 $\pm$ 62	0.53 $\pm$ 0.02	0.036 $\pm$ 0.004	18.9 $\pm$ 0.7
1,2-propandiolis	111 $\pm$ 24	0.63 $\pm$ 0.03	0.1 $\pm$ 0.02	11.2 $\pm$ 0.5
2-Amino-1,3-propanediolis	14170 $\pm$ 3870	0.55 $\pm$ 0.07	0.002 $\pm$ 0.0003	29.0 $\pm$ 3.6
(+/-)-3-amino-1,2-propandiolis	662 $\pm$ 143	0.14 $\pm$ 0.01	0.004 $\pm$ 0.0007	2.6 $\pm$ 0.2
(+/-)-3-chlor-1,2-propandiolis	159 $\pm$ 4	0.72 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.02	12.2 $\pm$ 0.1
2-propanolis (izo-propanolis)	13200 $\pm$ 1904	0.04 $\pm$ 0.003	0.0001 $\pm$ 0.00001	1.0 $\pm$ 0.07
Izo-butanolis	2100 $\pm$ 860	0.15 $\pm$ 0.01	0.001 $\pm$ 0.0005	2.6 $\pm$ 0.2
(2S,3S)-(-)-2,3-butanediolis	751 $\pm$ 108	0.36 $\pm$ 0.01	0.025 $\pm$ 0.005	19.1 $\pm$ 0.7
(+/-)-2-amino-1-feniletanolis	32100 $\pm$ 22400	0.48 $\pm$ 0.23	0.002 $\pm$ 0.0005	64.0 $\pm$ 3.1

Trans-4-aminocikloheksanolis	3470±1090	0.05±0.006	0.0002±0.00005	0.7±0.07
Dianhidro-D-glucitolis	30380±3990	0.038±0.002	0.00002±0.000002	0.7±0.03
1,4:3,6-Dianhidro-D-Mannitolis	4400±1880	0.017±0.003	0.00007±0.00002	0.3±0.05

Išanalizavus gautus rezultatus, galima teigti, kad geriausias substratas yra 1,2-propandiolis. Iš eksperimentinių duomenų matyti, kad 3-chloro funkcinės grupės įvedimas 1,2-propandiolui turėjo nedidelę įtaką fermento giminingumui. Tačiau 3-amino grupės įvedimas žymiai sumažino fermento giminingumą ir k_{red} sumažėjo nuo $0.1±0.02$ iki $0.004±0.0007 \mu M^{-1}s^{-1}$. Taip pat svarbi amino grupės padėtis 1,2-propandiolyje, nes K_M reikšmė 2-amino-1,3-propanedioliui yra apie dvidešimt kartų didesnė nei (+/-)-3-amino-1,2-propandiolui, o k_{red} reikšmė 2 kartus mažesnė.

Analogiškai tirtas ADH IIG alkoholio dehidrogenazės specifiškumas skirtingiems alkoholiams, panaudojant DMDHP⁺ (3 lentelė) ir ABTS⁺ (4 lentelė) katijon radikalus.

3 lentelė. Alkoholių oksidacijos, katalizuojamos ADH IIG, naudojant kaip mediatorių DHDMP⁺, kinetiniai parametrai. Sąlygos: 50 mM Tris/HCl buferinis tirpalas pH 8,0; 25 °C; 100 μM DHDMP⁺.

Alkoholiai	$K_M, \mu M$	$V_{max}, \mu M/s$	$k_{red}, \mu M^{-1}s^{-1}$	k_{kat}, s^{-1}
Glicerolis	2640±250	0.06±0.002	0.0004±0.00003	1.1±0.004
Etanolis	5570 ±1660	0.03±0.002	0.0001±0.00003	0.5±0.04
1-oktanolis	42±7	0.02±0.001	0.008±0.002	0.35±0.02
1,2-propandiolis	5.4± 0.8	0.044±0.001	0.15±0.05	0.8±0.02
2-Amino-1,3-propanediolis	-	-	0.0014±0.0003	-
(+/-)-3-amino-1,2-propandiolis	5280±1440	0.011±0.001	0.00004±0.000005	0.2±0.02
(+/-)-3-chlor-1,2-propandiolis	58±7	0.024±0.0006	0.0074±0.0014	0.43±0.01
2-propanolis (izo-propanolis)	103560±20440	0.22±0.03	0.0003±0.00005	29.9±4.5
Izo-butanolis	2330 ±370.	0.05±0.002	0.0013±0.0003	3.0±0.2
(2S,3S)-(-)-2,3-butanediolis	2960±320	0.04±0.002	0.017±0.0005	5.1±0.2

Analizuojant lentelėje pateiktus rezultatus galima teigti, kad geriausias reakingumas su ADH IIG, kaip ir FERI atveju, naudojant DHDMP⁺ nustatytas 1,2-propandiolui, $k_{red} = 0.15±0.05 \mu M^{-1}s^{-1}$. Iš gautų rezultatų matyti, kad chloro ir amino grupių įvedimas bei padėtis turi įtakos fermento

giminingumui. k_{red} sumažėjo nuo 0.15 ± 0.05 (1,2-propandiolis) iki 0.0074 ± 0.0014 ((+/-)-3-chlor-1,2-propandiolis), 0.0014 ± 0.0003 (2-amino-1,3-propanediolis), 0.00004 ± 0.000005 ((+/-)-3-amino-1,2-propandiolis) $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Amino grupės padėtis 1,2-propandiolui buvo svarbi, nes k_{red} reikšmė 2-amino-1,3-propanedioliui, lyginant su (+/-)-3-amino-1,2-propandioliu, sumažėjo 36 kartus.

4 lentelė. Alkoholių oksidacijos, katalizuojamos ADH IIG, naudojant kaip mediatorių ABTS⁺, kinetiniai parametrai. Sąlygos: 50 mM Tris/HCl buferinis tirpalas pH 8,0; 25 °C; 40 μM ABTS⁺.

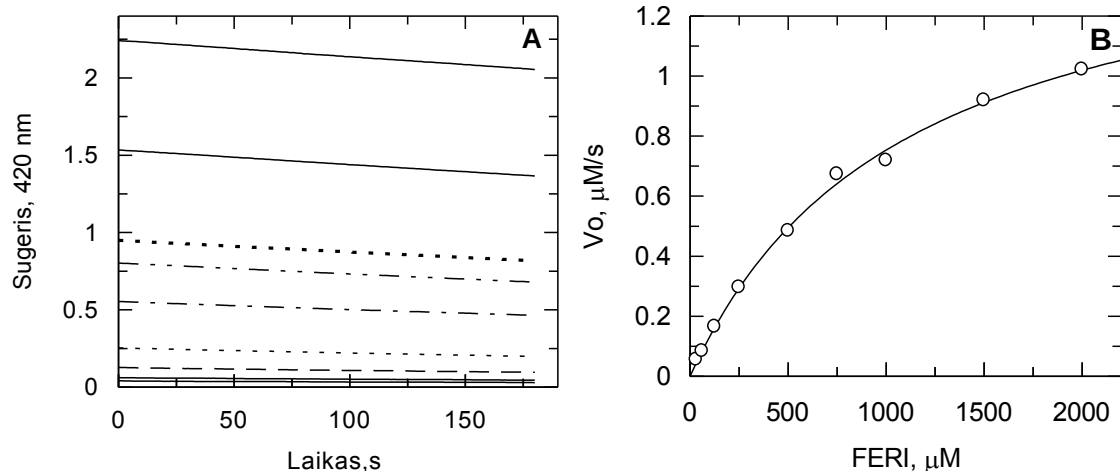
Alkoholiai	$K_M, \mu\text{M}$	$V_{max}, \mu\text{M/s}$	$k_{red}, \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_{kat}, s^{-1}
Glicerolis	1080 ± 350	0.017 ± 0.001	0.0042 ± 0.001	4.5 ± 0.4
Etanolis	58110 ± 1310	0.017 ± 0.001	0.0008 ± 0.0002	4.3 ± 0.2
1-oktanolis	81 ± 20	0.028 ± 0.002	0.09 ± 0.02	7.3 ± 0.5
1,2-propandiolis	76 ± 13	0.026 ± 0.001	0.09 ± 0.02	6.9 ± 0.3
2-amino-1,3-propanediolis	-	-	0.008 ± 0.001	-
(+/-)-3-amino-1,2-propandiolis	900 ± 190	0.016 ± 0.001	0.0005 ± 0.00008	0.42 ± 0.3
(+/-)-3-chlor-1,2-propandiolis	280 ± 45	0.09 ± 0.004	0.009 ± 0.001	2.4 ± 0.1
2-propanolis (izo-propanolis)	390 ± 76	0.08 ± 0.004	0.003 ± 0.0004	1.1 ± 0.05
Izo-butanolis	610 ± 162	0.01 ± 0.001	0.003 ± 0.0005	1.7 ± 0.1
(2S,3S)-(-)-2,3-butanediolis	2160 ± 440	0.024 ± 0.002	0.0032 ± 0.0001	6.4 ± 0.5

Didžiausias ADH IIG substratinis specifiskumas nustatytas 1-oktanolui ir 1,2-propandiolui, $k_{red} = 0,09 \pm 0,02 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o mažiausias specifiskumas nustatytas (+/-)-3-amino-1,2-propandiolui, $k_{red} = 0.0005 \pm 0.00008 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

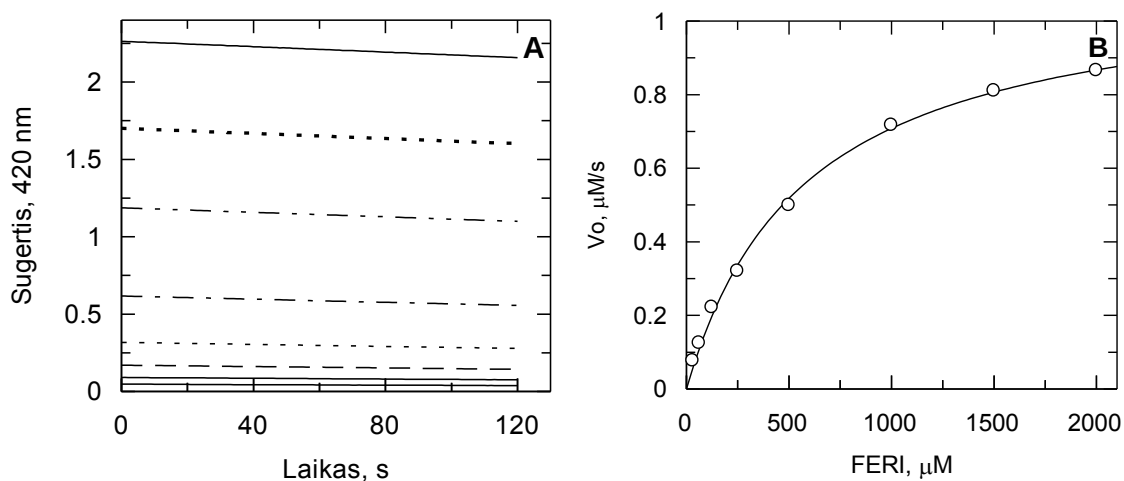
3.1.2. FERI, DHDMP⁺ ir ABTS⁺ reakingumo su redukuota ADH IIG tyrimas

Siekiant išsiaiškinti kuris iš mūsų tiriamų mediatorių yra geriausias elektronų akceptorius PQQ priklausomai ADH katalizuojamo proceso metu, kaip ir tiriant reakcijos greičio priklausomybę nuo alkoholių koncentracijų buvo ištirtos pradinio reakcijos greičio priklausomybės nuo mediatorių koncentracijų.

Tiriant priklausomybę nuo FERI koncentracijos gautos FERI sugerties mažėjimo kinetinės kreivės, kurios buvo aproksimuotos tiesės lygtimi, iš jų buvo paskaičiuoti pradiniai reakcijos greičiai. Pradinio reakcijos greičio priklausomybių nuo FERI koncentracijos aproksimacijai buvo taikoma Michaelio-Menten lygtis (31, 32 pav.).



31 pav. FERI sugerties mažėjimo kinetinės kreivės, esant skirtingoms FERI koncentracijoms (A) bei pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo FERI koncentracijos (B), reakciją katalizuojant ADH IIG. Eksperimento sąlygos: (A-B) - 30-2000 μM FERI, 25 mM glicerolio, kitos sąlygos kaip 29 pav.



32 pav. FERI sugerties mažėjimo kinetinės kreivės, esant skirtingoms FERI koncentracijoms (A) bei pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo FERI koncentracijos (B), reakciją katalizuojant ADH IIG. Eksperimento sąlygos: (A-B) - 30-2000 μM FERI, 30 mM 1,2-propandiolio, kitos sąlygos kaip 29 pav.

Iš pradinio reakcijos greičio priklausomybių nuo FERI koncentracijos su įvairiais alkoholiais nustatyti reakcijų kinetiniai parametrai ir redukuotos ADH IIG oksidacijos konstantos, kurios pateiktos 5 lentelėje.

5 lentelė. FERI redukcijos, katalizuojamos ADH IIG, kinetiniai parametrai. Sąlygos: 50 mM Tris/HCl buferinis tirpalas pH 8,0; 25 °C.

Alkoholiai	[Alkoholis], mM	K_M , μM	$V_{\max}$, $\mu\text{M/s}$	k_{oks} , $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_{kat} , s^{-1}
Glicerolis	25	1090±90	1.6±0.06	0.026±0.002	28.2±1.1
Etanolis	108	315 ±23	0.34±0.007	0.02±0.002	6.0±0.1
1-oktanolis	5	555±82	0.76±0.05	0.03±0.004	27.1±1.8
1,2-propandiolis	30	580±46	1.1±0.03	0.035±0.002	20.0±0.6
2-amino-1,3-propanediolis	20	1170±115	0.8±0.04	0.036±0.002	41.6±2.1
(+/-)-3-amino-1,2-propandiolis	20	213±33	0.19±0.01	0.016±0.002	3.3±0.2
(+/-)-3-chlor-1,2-propandiolis	10	620±110	2.2±0.2	0.047±0.005	29.3±2.3
2-propanolis (izo-propanolis)	20	132±39	0.072±0.006	0.014±0.026	1.9±0.2
Izo-butanolis	13.5	755±160	1.7±0.2	0.061±0.008	45.8±4.2
(2S,3S)-(-)-2,3-butanediolis	20	352±85	1.24±0.11	0.093±0.016	32.6±2.8
(+/-)-2-amino-1-feniletanolis	20	1540±630	0.21±0.05	0.018±0.005	28.3±6.6
Trans-4-aminocikloheksanolis	20	44.4±6.8	0.076±0.002	0.045±0.005	2.0±0.06
Dianhidro-D-glucitolis	20	24.4±11.8	0.068±0.005	0.037±0.024	0.9±0.07
1,4:3,6-Dianhidro-D-Mannitolis	20	165.5±21.5	0.51±0.02	0.081±0.008	13.4±0.5

Iš gautų rezultatų matyti, kad FERI sąveikos su redukuota ADH IIG konstantos nėra didelės ir priklauso nuo alkoholių prigimties. Didžiausia reaktingumo konstantos reikšmė nustatyta (2S,3S)-(-)-2,3-butanedioliui, $k_{\text{oks}} = 0.093 \pm 0.016 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Analogiškai tirtas ir DHDMP katijon-radikalo reaktingumas su ADH IIG alkoholio dehidrogenaze. Nustatytos redukuotos ADH IIG oksidacijos konstantos naudojant įvairius alkoholius ir DHDMP katijon-radikalą. Gauti reakcijų kinetiniai parametrai ir oksidacijos konstantos pateikti 6 lentelėje.

6 lentelė. DHDMP⁺ redukcijos, katalizuojamos ADH IIG, kinetiniai parametrai. Sąlygos: kaip lentelėje 5

Substratai	[Alkohol is], mM	K _M , μM	V _{max} , μM/s	k _{oks} , μM ⁻¹ s ⁻¹	k _{kat} , s ⁻¹
Glicerolis	30	18.5±3.0	0.076±0.06	0.073±0.009	1.4±0.07
Etanolis	108	11.7±2.3	0.04±0.002	0.061±0.016	0.7±0.04
1-oktanolis	0.25	8.7±1.1	0.035±0.001	0.07±0.01	0.6±0.02
1,2-propandiolis	20	26.7±0.86	0.16±0.002	0.11±0.002	2.8±0.04
2-amino-1,3- propanediolis	20	25.9±7.2	0.045±0.004	0.2±0.03	6.0±0.5
(+/-)-3-amino-1,2- propandiolis	20	6.8±1.5	0.018±0.001	0.03±0.006	0.2±0.01
(+/-)-3-chlor-1,2- propandiolis	20	13.0±0.9	0.03±0.001	0.041±0.002	0.54±0.01
2-propanolis (izo- propanolis)	20	2.4±0.3	0.025±0.0005	0.7±0.1	1.7±0.03
Izo-butanolis	13.5	12.3±2.9	0.02±0.002	0.25±0.04	3.1±0.2
(2S,3S)-(-)-2,3- butanediolis	20	29.1±6.1	0.057±0.005	0.26±0.04	7.6±0.7

Išanalizavus gautus rezultatus matyti, kad oksiduoto DHDMP⁺ sąveikos su redukuota ADH IIG konstantos reikšmė yra didžiausia naudojant 2-propanolį, jo oksidacinė konstanta buvo k_{oks} = 0.7±0.1μM⁻¹·s⁻¹.

Tirtas ir ABTS⁺ katijon-radikalo reakingumas su ADH IIG alkoholio dehidrogenaze naudojant įvairius alkoholius. Nustatyti reakcijų kinetiniai parametrai ir redukuotos ADH IIG oksidacijos konstantos. Rezultatai pateikti 7 lentelėje.

7 lentelė. ABTS⁺ redukcijos, katalizuojamos ADH IIG, kinetiniai parametrai. Sąlygos: kaip lentelėje 5

Substratai	[Alkoholi s], mM	K _M , μM	V _{max} , μM/s	k _{oks} , μM ⁻¹ s ⁻¹	k _{kat} , s ⁻¹
Glicerolis	10	3.1±0.8	0.028±0.0022	1.3±0.2	7.7±0.6
Etanolis	108	3.2±1.0	0.02±0.002	1.8±0.5	5.6±0.6
1-oktanolis	10	1.6±0.5	0.02±0.002	3.5±0.9	5.5±0.5
1,2-propandiolis	10	2.0±0.4	0.029±0.002	4.1±0.8	8.1±0.5
2-amino-1,3- propanediolis	10	3.4±0.5	0.02±0.001	7.1±1.6	50.8±2.1
(+/-)-3-amino- 1,2-propandiolis	10	4.6±1.5	0.028±0.003	0.9±0.4	7.5±0.8

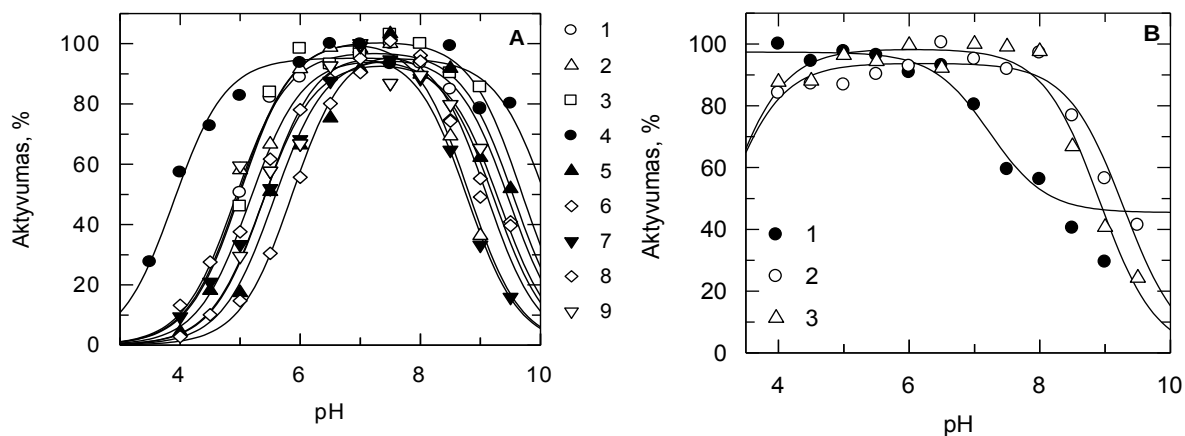
(+/-)-3-chlor-1,2-propandiolis	2.5	2.6±0.9	0.038±0.004	4.0±1.0	10.5±1.0
2-propanolis (izo-propanolis)	20	5.3±1.4	0.024±0.002	0.6±0.1	3.2±0.3
Izo-butanolis	13.5	13.2±4.8	0.01±0.002	0.56±0.1	6.7±1.2
(2S,3S)-(-)-2,3-butanediolis	10	1.3±0.3	0.020±0.001	4.0±0.8	5.3±0.3

Analizuojant lentelėje pateiktus rezultatus galima teigti, kad geriausias reakingumas buvo gautas su 2-amino-1,3-propanedioliu, $k_{oks} = 7.1 \pm 1.6 \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$. Taip pat iš gautų rezultatų matyti, kad redukuotos ADH IIG reakcijos su ABTS⁺ reakingumo (oksidacijos) konstantų reikšmės gautos didesnės, lyginant su konstantų reikšmėmis gautomis su FERI ir DHDMP⁺.

3.1.3. pH įtaka ADH IIG aktyvumui

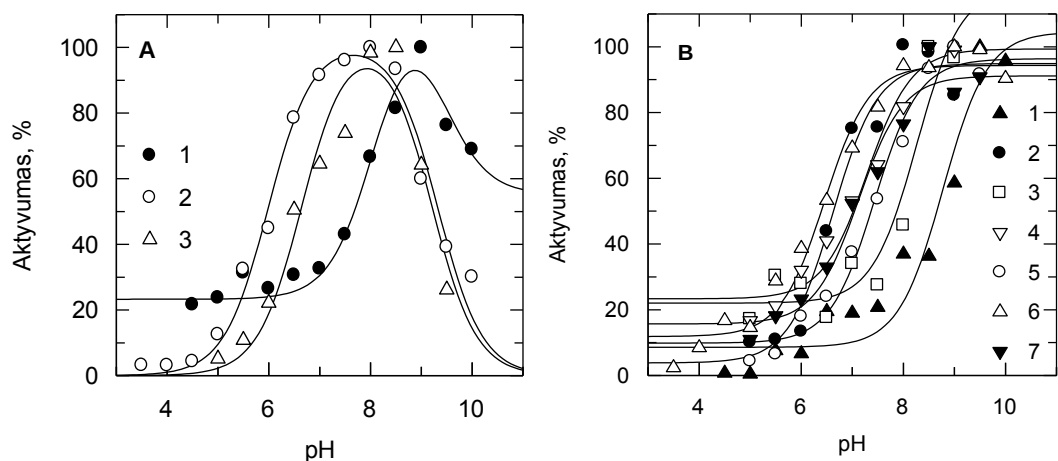
pH poveikis ADH IIG aktyvumui su skirtingais alkoholiais tirtas naudojant spektrofotometrinį metodą. Eksperimento metu substrato, mediatoriaus ir fermento koncentracijos buvo pastovios, keičiamas tik buferinio tirpalo pH (3,5-10,0).

33 pav. pateiktos ADH IIG aktyvumo priklausomybės nuo buferinio tirpalo pH su įvairiais alkoholiais. Didžiausias aktyvumas buvo stebimas pH intervale tarp 6.5 ir 8.0, kai ADH IIG oksiduoja glicerolį, 1-oktanolį, 1,2-propandiolį, (+/-)-3-chloro-1,2-propandiolį, izobutanolį ir etanolį (33 pav., A). ADH IIG aktyvumo mažėjimas stebimas rūgštiniame arba šarminiame pH. Maksimalus fermento aktyvumas buvo stebimas plačiame pH intervale, kai oksiduojami (+/-)-3-amino-1,2-propandiolis, 2-amino-1,3-propandiolis (4,5-8,0) (33 pav., B), o 2-propanolis (5,0-9,5) (33 pav., A). Oksiduojuojant (2S,3S)-(+)-2,3-butandiolį ir 1,4:3,6-dianhidro-D-mannitolą maksimalus aktyvumas stebimas labiau šarminiame buferiniame tirpale (33 pav., A). 2-amino-1-feniletanolis geriau oksiduojamas rūgštiniame pH intervale ir maksimalus oksidacijos greitis stebimas pH intervale 4,0-6,5 (33 pav., B).



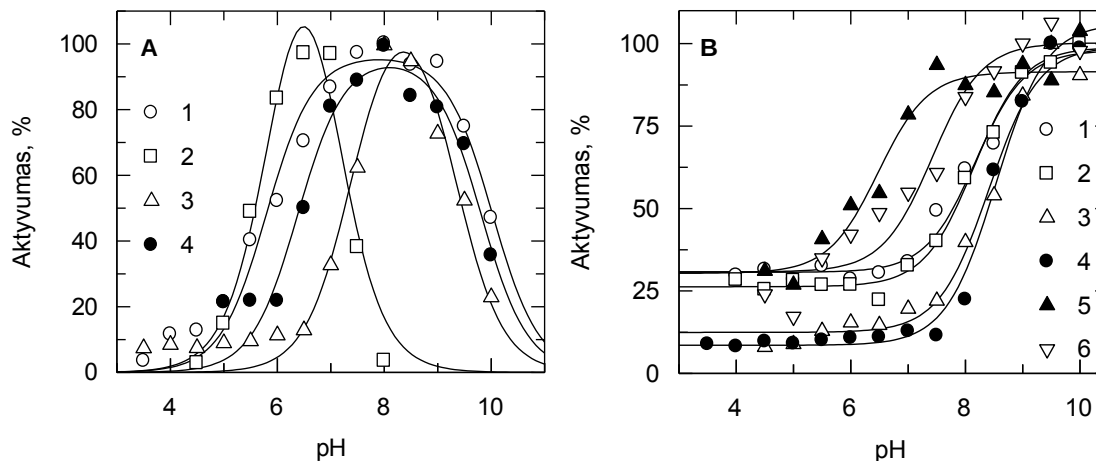
33 pav. ADH IIG aktyvumo priklausomybė nuo pH su alkoholiais naudojant kaip mediatorių FERI. Eksperimento sąlygos: (A-B) - 50 mM Tris/HCl buferinis tirpalas; 1 mM FERI; **A:** 30 mM glicerolis (1), 10 mM 1,2-propandiolis (2), 10 mM (+/-)-3-chloro-1,2-propandiolis (3), 20 mM 2-propanolis (4), 10 mM (2S,3S)-(+)-2,3-butandiolis (5); 108 mM etanolis (6), 20 mM izobutanolis (7), 20 mM 1,4:3,6-dianhidro-D-mannitolas (8), 10 mM 1-oktanolis (9); **B:** 10 mM 2-amino-1-feniletanolis (1), 20 mM (+/-)-3-amino-1,2-propandiolis (2), 20 mM 2-amino-1,3-propandiolis (3)

Analogiškai tirta ADH IIG aktyvumo priklausomybė nuo pH kaip mediatorius naudojant DHDMP (34 pav.) ir ABTS katijon-radikalus (35 pav.).



34 pav. ADH IIG aktyvumo priklausomybė nuo pH su alkoholiais naudojant kaip mediatorių DHDMP. Eksperimento sąlygos: (A-B) - 50 mM Tris/HCl buferinis tirpalas; 100 μ M DHDMP⁺; **A:** 20 mM 2-amino-1,3-propandiolis (1), 20 mM 2-propanolis (2), 25 mM glicerolis (3); **B:** 10 mM (2S,3S)-(+)-2,3-butandiolis (1), 250 μ M 1-oktanolis (2), 20 mM (+/-)-3-amino-1,2-propandiolis (3), 1.25 mM (+/-)-3-chloro-1,2-propandiolis (4), 108 mM etanolis (5), 20 mM izobutanolis (6), 2.5 mM 1,2-propandiolis (7)

Varpo formos aktyvumo priklausomybės nuo pH gautos oksiduojant ADH IIG alkoholio dehidrogenaze 2-amino-1,3-propandiolį, 2-propanolį ir glicerolį (34 pav., A), naudojant kaip mediatorių DHDMP⁺. Optimalios pH reikšmės, 2-amino-1,3-propandiolui stebimos pH intervale 8,5-9,5, 2-propanoliui 7,0-8,5 ir gliceroliui 8,0-8,5. Naudojant (2S,3S)-(+)-2,3-butandiolį, 1-oktanolį, (+/-)-3-amino-1,2-propandiolį, (+/-)-3-chloro-1,2-propandiolį, etanolį, izobutanolį, 1,2-propandiolį kaip substratus gauta, kad fermento aktyvumas didėja šarmėjant buferiniam tirpalui (34 pav. B).



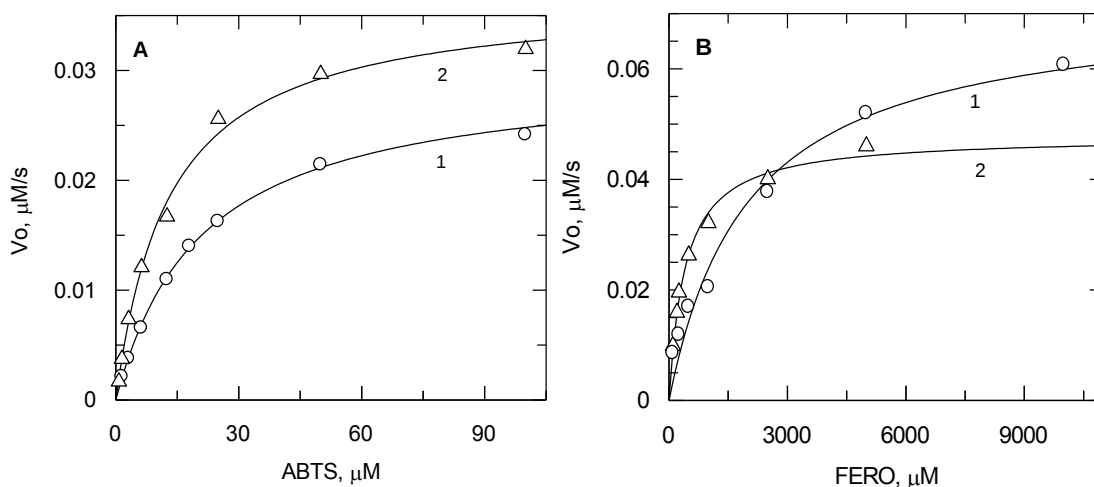
35 pav. ADH IIG aktyvumo priklausomybė nuo pH su alkoholiais naudojant kaip mediatorių ABTS⁺. Eksperimento sąlygos: (A-B) - 50 mM Tris/HCl buferinis tirpalas; 40 μ M ABTS⁺; **A:** 10 mM (+/-)-3-chloro-1,2-propandiolis (1), 20 mM 2-propanolis (2), 10 mM glicerolis (3), 10 mM (2S,3S)-(+)-2,3-butandiolis (4); **B:** 20 mM (+/-)-3-amino-1,2-propandiolis (1), 10 mM 2-amino-1,3-propandiolis (2), 13.5 mM izobutanolis (3), 108 mM etanolis (4), 10 mM 1-oktanolis (5), 10 mM 1,2-propandiolis (6)

Iš 35 pav., A matyti, kad oksiduojant (+/-)-3-chloro-1,2-propandiolį, (2S,3S)-(+)-2,3-butandiolį ADH IIG alkoholio dehidrogenaze ir kaip mediatorių naudojant ABTS⁺, optimalios pH reikšmės yra panašios ir stebimos pH intervale 7,0-9,0. Maksimalus aktyvumas labiau šarminiame buferiniame tirpale stebimas, kai ADH IIG oksiduoja glicerolį, o 2-propanolis geriau oksiduojamas rūgštiniame pH ir maksimalus aktyvumas stebimas pH intervale 6,0-7,0 (35 pav., A). Maksimalus fermento aktyvumas buvo stebimas šarminiame pH intervale, kai oksiduojami (+/-)-3-amino-1,2-propandiolis, 2-amino-1,3-propandiolis, izobutanolis, etanolis, 1-oktanolis, 1,2-propandiolis (35 pav., B). Iš gautų rezultatų matyti, kad šarminėje pH srityje, pK_a reikšmės substratams yra panašios, išskyrus 1-oktanolį ir 1,2-propandiolį.

3.2. Spektrofotometriniai lakazės L95 katalizuojamų virsmų tyrimai

3.2.1. Spektrofotometriniai lakazės L95 katalizuojami substratų oksidacijos tyrimai

Tirta ABTS ir FERIO oksidacija katalizuojama L95 lakazės skirtinguose buferiniuose tirpaluose (36 pav.). Spektrofotometriškai registruojant ABTS ir FERIO sugerties kitimą esant 414 nm bangos ilgiui, bei 420 nm bangos ilgiui atitinkamai, naudojant skirtingas substrato koncentracijas, gautos sugerties kitimo laike kreivės. Iš jų paskaičiuoti pradiniai reakcijų greičiai aproksimuojant kinetines kreives tiesės lygtimi ir gautos pradinių reakcijos greičių (V_0) priklausomybės nuo substrato koncentracijų.



36 pav. Pradinio reakcijos greičio priklausomybės nuo ABTS (A) ir FERIO (B) koncentracijų, reakciją katalizuojant L95 lakaze. Eksperimento sąlygos: 50 mM acetatinis buferinis tirpalas (1) pH 5,5; 50 mM fosfat-citratinis (2) buferinis tirpalas pH 5,5; 25 °C; 0,21 nM L95

Tiriant pradinio reakcijos greičio priklausomybę nuo substrato koncentracijos, gautos hiperbolinės kreivės, kurias galima aprašyti Michaelio-Menten lygtimi (36 pav.). Pagal šią lygtį iš eksperimentinių reakcijos greičio priklausomybių nuo ABTS ir FERIO koncentracijų, nustatytos tariamosios K_M bei V_{max} reikšmės, bei apskaičiuotos oksidacijos ir katalitinės konstantos. Kinetinių parametų reikšmės gautos acetatiniame ir fosfat-citratiniame buferiniuose tirpaluose skiriasi. ABTS ir FERIO oksidaciją katalizuojant L95 lakaze oksidacinės konstantos atitinkamai lygios acetatiniame buferiniame tirpale $6,8 \pm 0,4$ ir $0,17 \pm 0,06$, o fosfat-citratiniame buferiniame tirpale $14,7 \pm 1,4$ ir $0,53 \pm 0,05$ $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (8 lentelė).

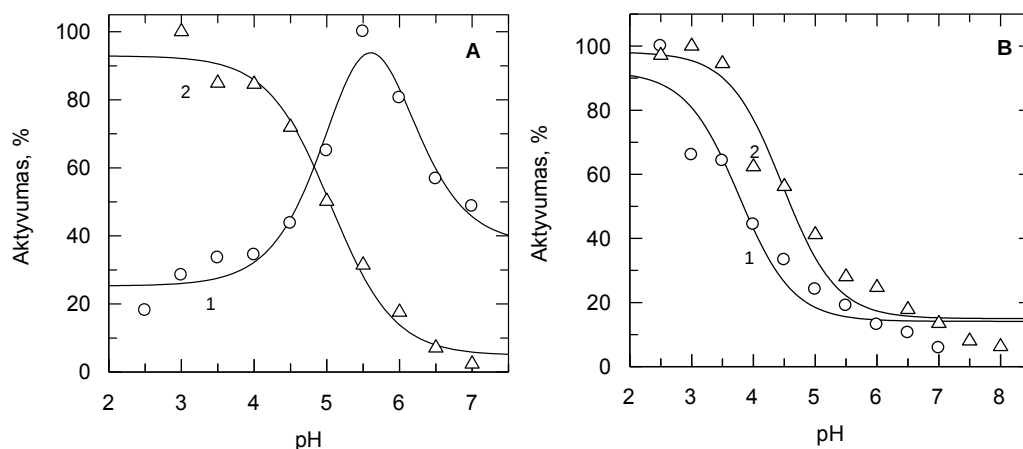
8 lentelė. Grybine L95 lakaze katalizuojamų substratų oksidacijos kinetinių parametų reikšmės

Substratai	Buferinis tirpalas	K_M , μM	$V_{\max}$, $\mu\text{M/s}$	k_{oks} , $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_{kat} , s^{-1}
ABTS	Acetatinis	21±1	0.03±0.001	6.8±0.4	143±5
	Fosfat-citratinis	13±1	0.04±0.001	14.7±1.4	191±3
FERO	Acetatinis	2010±450	0.072±0.006	0.17±0.06	343±28
	Fosfat-citratinis	405±38	0.045±0.001	0.53±0.05	214±5

Iš gautų rezultatų matyti, kad oksidacinės konstantos, naudojant FERO yra žymiai mažesnės, lyginant su oksidacinėmis konstantomis, gautomis naudojant ABTS.

3.2.2. pH įtaka L95 aktyvumui

Tirtas pH poveikis L95 lakazės aktyvumai su ABTS ir FERO (37 pav.). Aktyvumo priklausomybei nuo pH nustatyti buvo pasirinktas pH intervalas 2,5 – 8,0. 37 pav. pateiktos ABTS (A) ir FERO (B) aktyvumo priklausomybės nuo buferinių tirpalų pH. Varpo formos aktyvumo priklausomybė nuo pH gauta oksiduojant ABTS lakaze L95 (37 pav., A). Iš 37 pav., A matyti, kad naudojant acetatinį buferinį tirpalą su ABTS maksimalus aktyvumas stebimas 5,5 – 6,0 pH intervale. Tačiau naudojant fosfat-citratinį buferinį tirpalą didžiausias aktyvumas stebimas, esant pH 2,5. Naudojant FERO kaip substratą gauta, kad aktyvumas didėja rūgštelėjant buferiniam tirpalui ir didžiausias aktyvumas pasiekiamas esant pH 2,5 – 3,5 (37 pav., B).

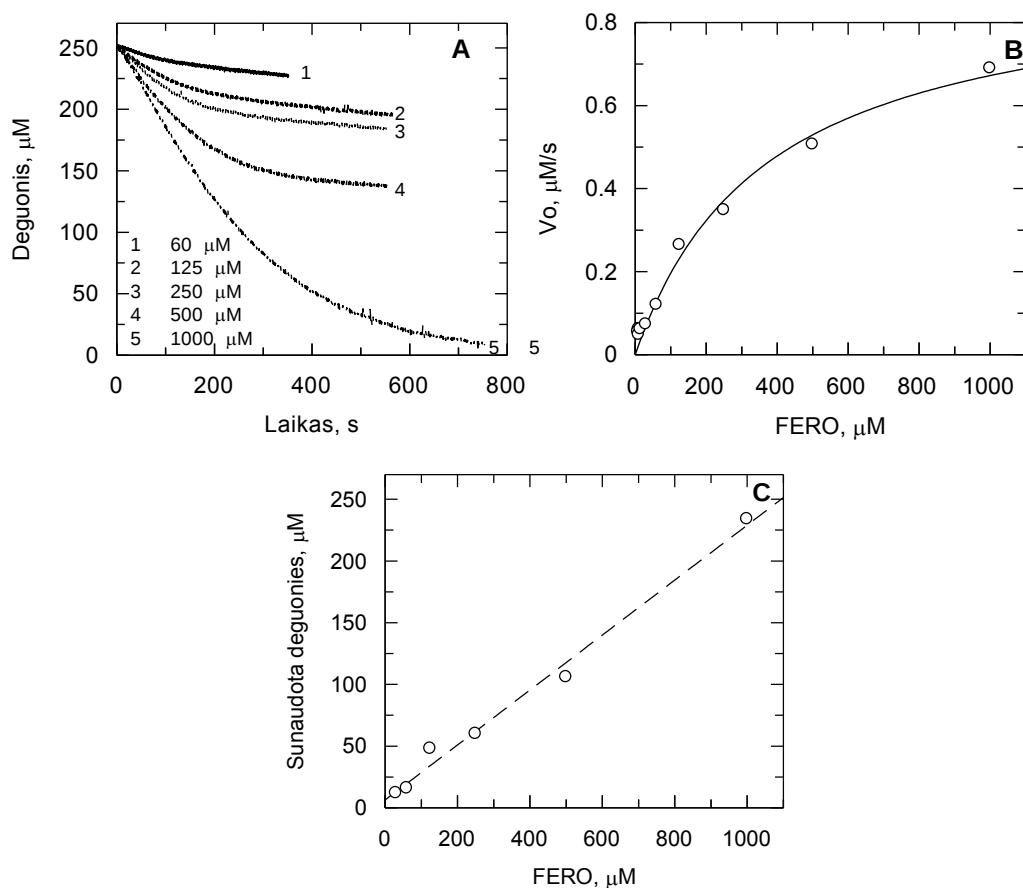


37 pav. L95 aktyvumo priklausomybė nuo pH. Eksperimento sąlygos: 100 μM ABTS (A), 10 mM FERO (B); (A-B) - 50 mM acetatinis buferinis tirpalas (1), 50 mM fosfat-citratinis buferinis tirpalas (2) ; 0,21 nM L95 (1-2)

3.3. Tyrimai deguoniniu elektrodu

3.3.1. L95 lakazės katalizuojamų virsmų tyrimai deguoniniu elektrodu

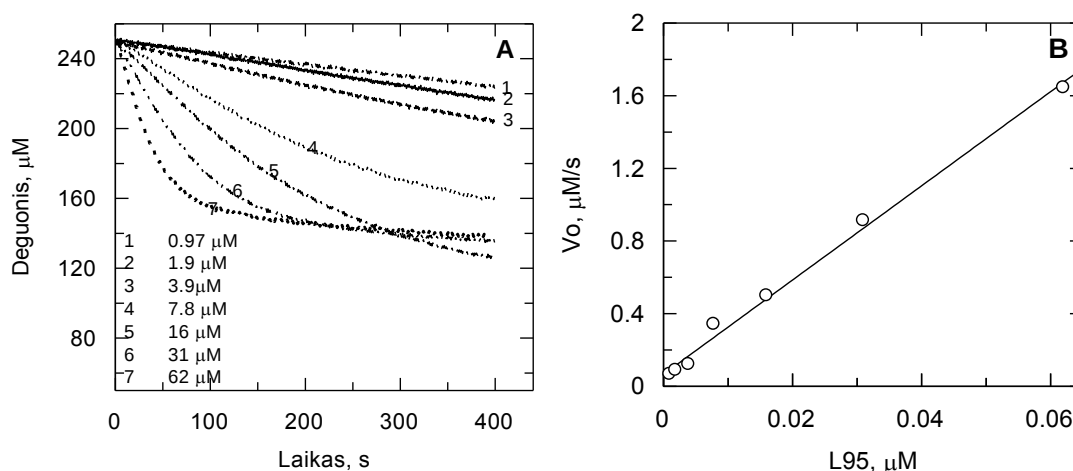
Tirta FERŲ oksidacija, katalizuojama L95 lakaze. Naudojant deguoninį elektrodą buvo registruojamas srovės kitimas reakcijos metu. Gautos srovės kitimo kreivės laike (38 pav., A), perskaičiuotos į deguonies sunaudojimo kinetines kreives, priimant, kad deguonies soties koncentracija lygi 250 μM . Iš deguonies sunaudojimo kreivių buvo paskaičiuotas pradinis reakcijos greitis (38 pav., B) bei sunaudoto deguonies koncentracijos priklausomybė nuo FERŲ koncentracijos (38 pav., C). Pradinis deguonies sunaudojimo greitis skaičiuotas aproksimuojant kinetines kreives tiesės lygtimi ir gautos pradinio reakcijos greičių (V_0) priklausomybės nuo FERŲ koncentracijos (38 pav., B). Nustatytos K_M ir $V_{\max}$ reikšmės, kurios atitinkamai lygios $370 \pm 62 \mu\text{M}$ ir $0.9 \pm 0.07 \mu\text{M/s}$.



38 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, esant skirtingoms FERŲ koncentracijoms (A), sunaudoto deguonies pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo FERŲ koncentracijos (B) ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo FERŲ koncentracijos (C). Eksperimento salygos: (A-B) - 50 mM fosfat-citratinis buferinis tirpalas pH 5,5; 10 mM glicerolio, 62 nM L95

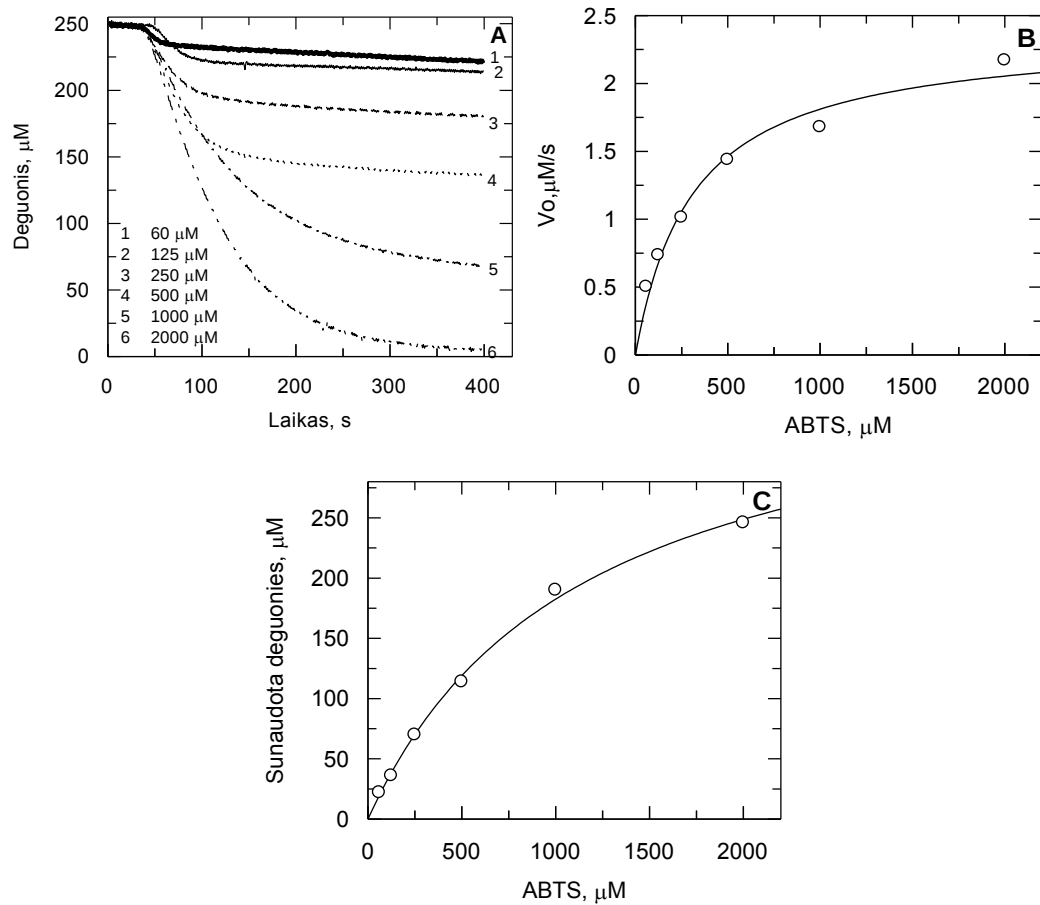
Tiriant deguonies sunaudojimo pradinio greičio priklausomybę nuo FERO koncentracijos gauta, kad didinant substrato koncentraciją deguonies sunaudojimo greitis didėja hiperboliškai (38 pav., B). O 1 mM FERO suoksiduoti reikia 250 μM deguonies.

Naudojant ABTS buvo tirta pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo lakazės koncentracijos (39 pav.). Iš kurios matyti, kad pradinis reakcijos greitis tiesiai proporcingas fermento koncentracijai (39 pav., B). Remiantis šiais rezultatais pasirinkta fermentų koncentracija tolimesniems tyrimams.



39 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, esant skirtingoms FERI koncentracijoms (A) ir sunaudoto deguonies pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo L95 koncentracijos oksiduojant ABTS (B). Eksperimento sąlygos: 500 μM ABTS

Naudojant deguoninį elektrodą buvo registruojamas deguonies koncentracijos kitimas esant skirtingoms ABTS koncentracijoms. Gautas deguonies sunaudojimo kitimo kreivės laike (40 pav., A). Iš kurių paskaičiuoti pradiniai reakcijų greičiai ir gauta pradinių reakcijos greičių (V_0) priklausomybė nuo ABTS koncentracijos (40 pav., B), bei nustatyti kinetiniai $K_M = 310.9 \pm 60.1 \mu\text{M}$ ir $V_{\max} = 2.37 \pm 0.15 \mu\text{M/s}$ parametrai. Iš gautų deguonies koncentracijos kitimo kreivių paskaičiuota deguonies kiekis reikalingas oksiduoti skirtingas ABTS koncentracijas (40 pav., C).



40 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, esant skirtingoms ABTS koncentracijoms (A), sunaudoto deguonies pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo ABTS koncentracijos (B) ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo ABTS koncentracijos (C). Eksperimento salygos: (A-C) - 124 nM L95, kitos sąlygos kaip 38 pav.

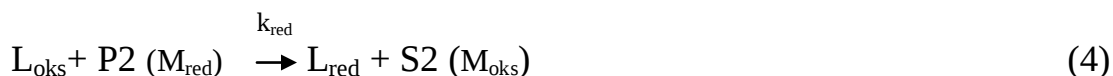
3.3.2. Alkoholio oksidacijos katalizuojamos ADH IIG, kai ADH oksiduojantis mediatorius yra regeneruojamas schema

Alkoholio dehidrogenazė katalizuoja reakcijas, kuriose dalyvauja du substratai. Oksiduota alkoholio dehidrogenazės forma katalizuoja alkoholio oksidaciją, kurios metu susidaro alkoholio oksidacijos produktas, redukuojantis ADH. Redukuota fermento forma oksiduoja mediatorių (antrą substratą) iki mediatoriaus redukcijos produkto. Tokias reakcijas galima pavaizduoti sekančiomis lygtimis:



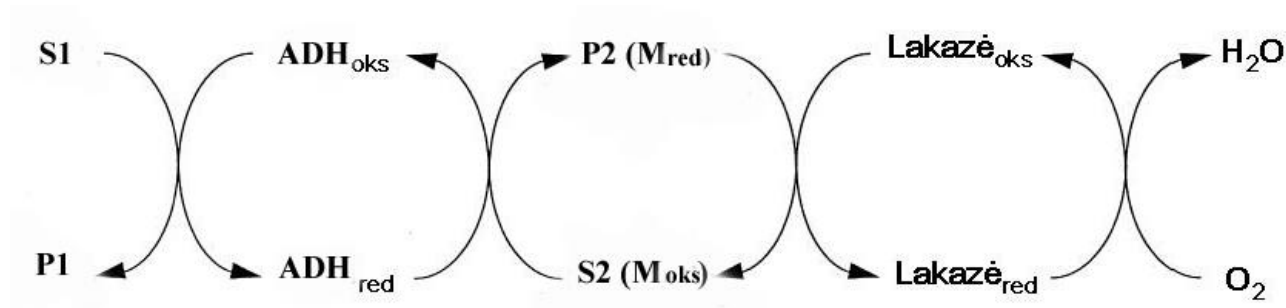
kur ADH_{oks} , ADH_{red} – atitinkamai oksiduota ir redukuota ADH formos, P1 – alkoholio oksidacijos produktas, P2 – mediatoriaus redukcijos produktas, S1 – alkoholis, S2 – mediatorius.

Lakazė sąveikauja su deguonimi oksiduodama jį iki vandens. Toliau oksiduota lakazės forma sąveikauja su mediatoriaus redukcijos produktu oksiduodama jį iki oksiduotos mediatoriaus formos. Šiuos procesus galima aprašyti 3 – 4 lygtimis:



kur L_{oks} , L_{red} – oksiduota ir redukuota lakazės formos, P2 – mediatoriaus redukcijos produktas, S2 – mediatorius.

Šiuos 1-4 lygtimi aprašytus virsmus galima pavaizduoti sekančia shema pateikta 41 pav.



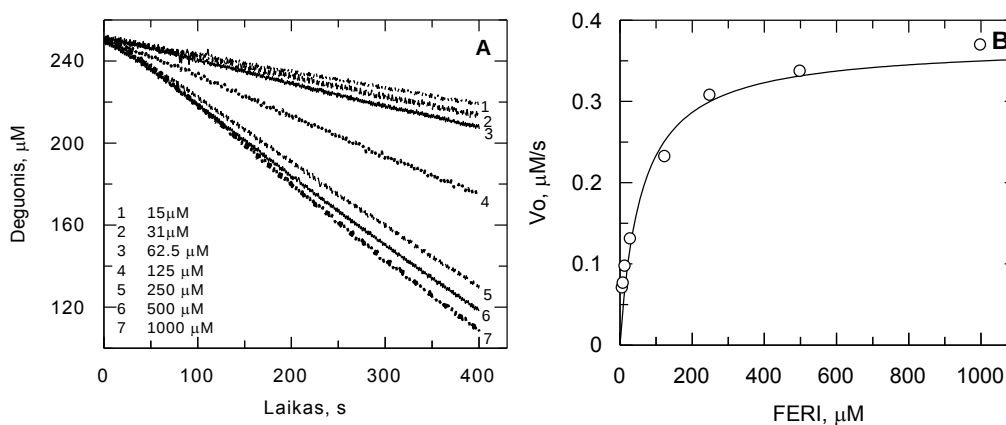
41 pav. Alkoholio oksidacijos katalizuojamos ADH IIG schema, kai ADH oksiduojantis mediatorius (S2) yra regeneruojamas lakaze, dalyvaujant deguoniui

Norint patikrinti ar pavaizduota 41 pav. schema veikia, buvo naudotas deguoninis elektrodas ir sekamas deguonies kitimas vykstant katalitiniams procesams.

Remiantis pasiūlyta biokonversijos schema buvo atlikta eilė eksperimentų naudojant deguoninį elektrodą. Kadangi spektrofotometriškai šių virsmų negalima stebėti, nes paprastai vykstančios reakcijos buvo sekamos pagal mediatoriaus oksidaciją ar redukciją. Iš biokonversijos schemos matyti, kad vykstant mediatoriaus regeneravimui, jo koncentracija tirpale praktiškai nekinta, t.y. spektrofotometriškai sugerties kitimas (vykstant mediatoriaus oksidacijai ir redukcijai) nebus stebimas. Fermentų (L95 ir ADH IIG) bei mediatorių koncentracijos buvo parinktos iš ankstesnių tyrimų. Parinkta nedidelė mediatoriaus koncentracija, o ADH IIG fermento koncentracija naudojama didelė, nes ADH IIG katalizuojamos alkoholių oksidacijos bei mediatorių redukcijos konstantos nėra didelės.

3.3.3. Alkoholio biokonversijos sistemos tyrimai deguoniniu elektrodu

Tirta kaip deguonies sunaudojimo pradinis greitis priklauso nuo FERI koncentracijos, kai reakcijos mišinyje yra 10 mM glicerolio, 137 nM. ADH IIG, 62 nM L95 (42 pav.). Gauta, kad didinant substrato koncentraciją deguonies sunaudojimo greitis didėja. Gauta hiperbolinė pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo FERI koncentracijos pateikta 42 pav., B. Nustatytos tariamosios K_M bei V_{max} reikšmės, kurios lygios $K_M=58.5\pm16.1 \mu\text{M}$ ir $V_{max}=0.37\pm0.026 \mu\text{M/s}$.

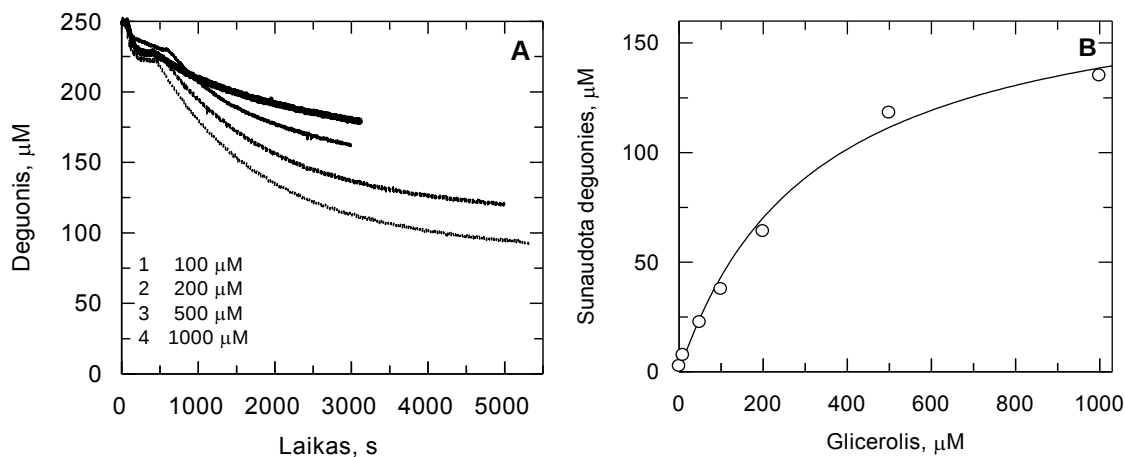


42 pav. Deguonies koncentracijos kitimas laike, esant skirtingoms FERI koncentracijoms (A) ir sunaudoto deguonies pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo FERI koncentracijos (B).

Eksperimento salygos: (A-B) - 50 mM fosfat-citratinis buferinis tirpalas pH 5,5; 10 mM glicerolio, 137 nM. ADH IIG, 62 nM L95

Matuojant deguonies sunaudojimą esant skirtingoms glicerolio ir 1,2-propandiolio koncentracijoms, buvo gautos kinetinės deguonies sunaudojimo kreivės, kurios pateiktos pav. 43, 45. Iš kurių paskaičiuoti sunaudotos deguonies priklausomybės nuo substratų koncentracijų.

Imtas skirtumas tarp pradinės deguonies koncentracijos ir galutinės, tokiu būdu fiksuojant, kiek deguonies buvo sunaudota FERŖ oksidacijos metu.

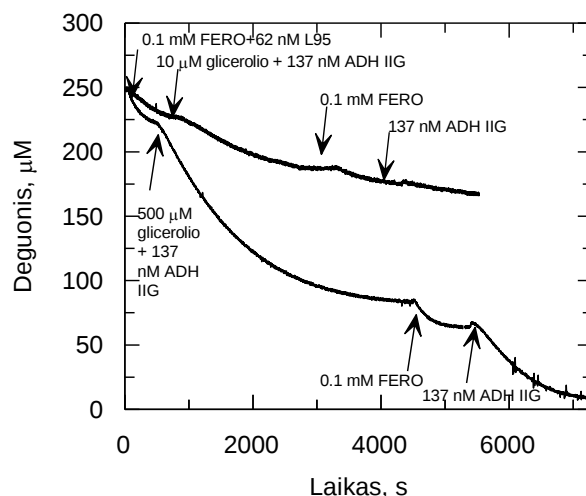


43 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant FERŖ kaip mediatorių ir skirtingas glicerolio koncentracijas (A) ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos (B).

Eksperimento salygos: (A-B) - 0,1 mM FERŖ, kitos salygos kaip 42 pav.

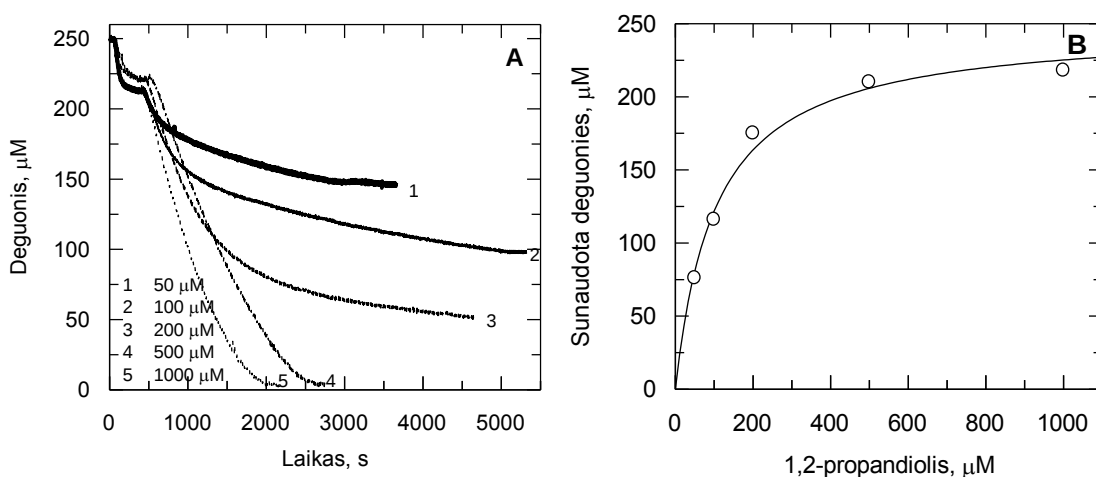
Tiriant deguonies sunaudojimą vykstant ADH IIG katalizuojamai glicerolio oksidacijai bei L95 lakazės katalizuojamai FERŖ regeneracijai pastebėta, kad ne visas deguonis yra sunaudojamas, naudojant dideles (1 mM) glicerolio koncentracijas. Todėl norint išaiškinti dėl kokių priežasčių proceso metu deguonis nėra pilnai sunaudojamas buvo atlikti tolimesni tyrimai.

Pirmiausia buvo patikrinta ar regeneracijos proceso metu naudojama pakankama FERŖ koncentracija, papildomai pridedant į sistemą FERŖ (44 pav.). Iš gautų rezultatų matyti, kad FERŖ pridėjimas proceso neįtakoja, o tik duoda atsaką būdingą šiai FERŖ koncentracijai.



44 pav. ADH IIG inhibicija.

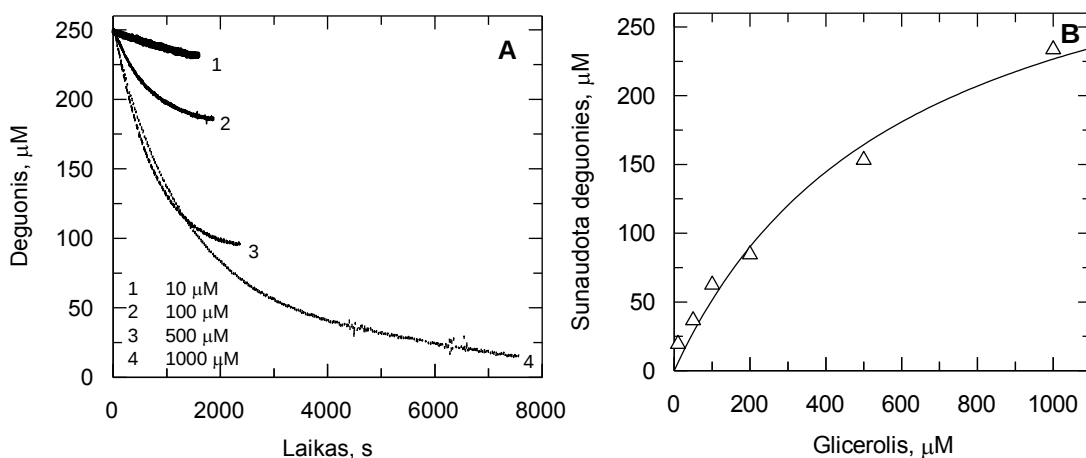
Tada papildomai buvo pridėta ADH IIG. Iš 44 pav. matyti, kad reakcijos metu įdėjus ADH IIG deguonis iki galo susinaudojo. Todėl galime teigti, kad proceso metu ADH IIG yra inaktyvuojama. Yra žinoma, kad glicerolio oksidacijos produktu gali būti dihidroksiacetonas arba gliceraldehidai, todėl buvo pabandyta patikrinti koks junginys susidaro ir ar susidarantis junginys neveikia fermento aktyvumo. Buvo pabandyta į reakcijos mišinį pridėti 1,3-dihidroksiacetono ir jo dimero, nes 1,2-dihidroksiacetonas yra nestabilus. Gauti rezultatai parodė, kad šie junginiai regeneracijos procesą neįtakoja. Tada į reakcijos mišinį buvo pridėta 2,4-dinitrofenilhidrozino ir buvo gautas geltonos spalvos tirpalas. Tai reiškia, kad proceso metu greičiausiai susidaro aldehidai, kurie proceso metu veikia fermentą.



45 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant FER0 kaip mediatorių ir skirtingas 1,2-propandiolio koncentracijas (A) ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo 1,2-propandiolio koncentracijos (B). Eksperimento salygos: (A-B) - 50 mM fosfat-citratinis buferinis tirpalas pH 5,5; 62 nM L95, kitos sąlygos kaip 42 pav.

Iš 45 pav. matyti, kad esant mažoms substratų koncentracijoms, deguonies koncentracijos kitimas vyksta lėtai, bet greitėja didinant substrato koncentraciją.

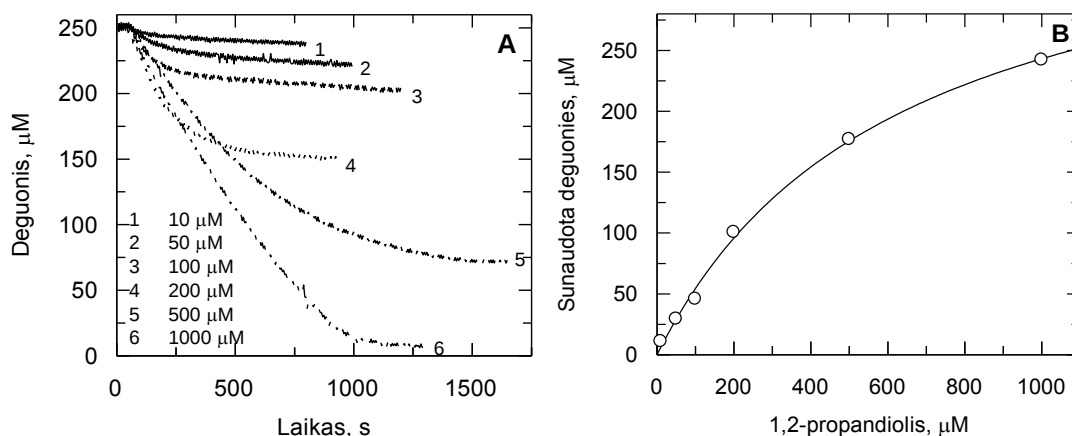
Kaip ir ankstesnių tyrimų metu norint sužinoti kiek buvo sunaudota deguonies DHDMP⁺ redukcijos metu, iš deguonies sunaudojimo kreivių (46, 47 pav., A) buvo paskaičiuota sunaudoto deguonies priklausomybė nuo glicerolio (46 pav., B) ir 1,2-propandiolio koncentracijų (47 pav., B).



46 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant DHDMP⁺ kaip mediatorių ir skirtingas glicerolio koncentracijas (A) ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos (B).

Eksperimento sąlygos: (A-B) - 100 μM DHDMP⁺; kitos sąlygos kaip 42 pav.

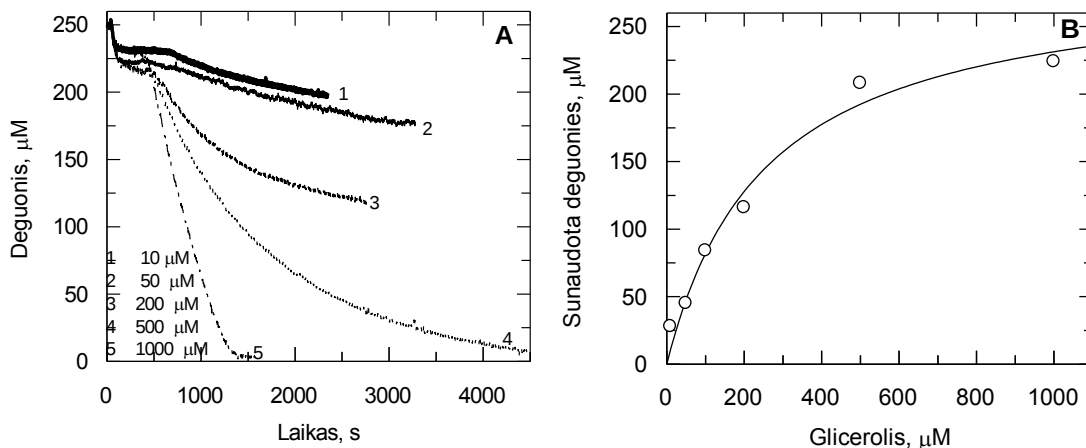
Skaiciavimams buvo imtas skirtumas tarp pradinės deguonies koncentracijos ir galutinės. Tokiu būdu buvo fiksuojama, kiek deguonies sunaudota oksidacijos metu.



47 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant DHDMP⁺ kaip mediatorių ir skirtingas 1,2-propandiolio koncentracijas (A) ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo 1,2-propandiolio koncentracijos (B). Eksperimento sąlygos: (A-B) - 100 μM DHDMP⁺; kitos sąlygos kaip 42 pav.

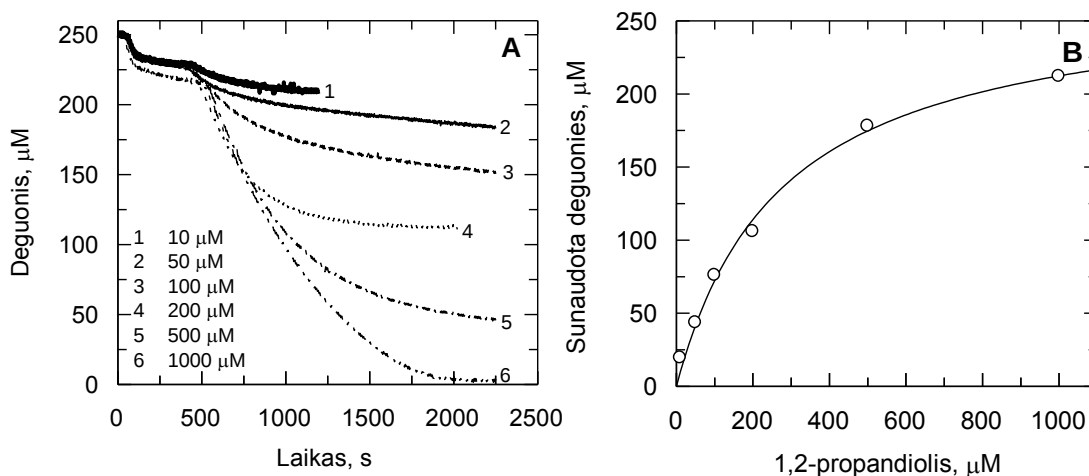
Tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip FER0 atveju, buvo matuojamos deguonies sunaudojimo priklausomybės esant skirtingoms glicerolio (48 pav.) ir 1,2-propandiolio (49 pav.) koncentracijoms, naudojant ABTS. Matavimai atlikti nuo 10 iki 1000 μM substratų koncentracijos intervale.

Buvo gautas deguonies koncentracijos kitimas laike naudojant skirtingas glicerolio (48 pav., A) ir 1,2-propandiolio (49 pav., A) koncentracijas. Iš kurių paskaičiuotos sunaudotos deguonies priklausomybės nuo substratų koncentracijų (48, 49 pav., B).



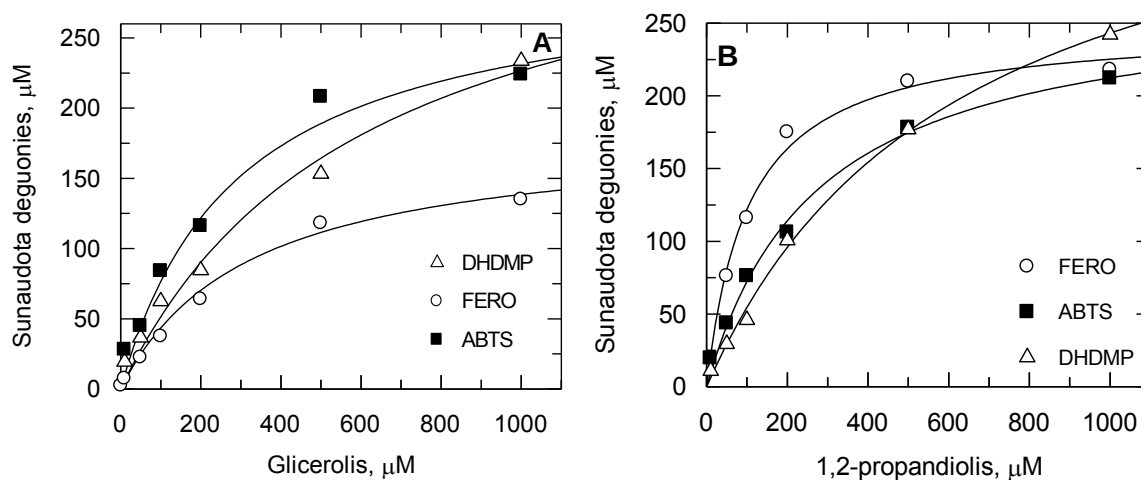
48 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant ABTS kaip mediatorių ir skirtingas glicerolio koncentracijas (A) ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos (B).

Eksperimento sąlygos: (A-B) - 100 μM ABTS, kitos sąlygos kaip 42 pav.



49 pav. Deguonies koncentracijos kitimas, naudojant ABTS kaip mediatorių ir skirtingas 1,2-propandiolio koncentracijas (A) ir sunaudoto deguonies priklausomybė nuo 1,2-propandiolio koncentracijos (B). Eksperimento sąlygos: (A-B) - 100 μM ABTS, kitos sąlygos kaip 42 pav.

Lyginant sunaudoto deguonies priklausomybes nuo alkoholio koncentracijos, kai naudojami skirtingi mediatoriai, galima pastebėti, kad oksiduojant glicerolį deguonies sunaudojimas yra žymiai mažesnis naudojant ferocianidą (50 pav., A). Iš gautų priklausomybių matome, kai naudojami ABTS ir DHDMP⁺, oksiduojant glicerolį, proceso metu sunaudojama daugiau deguonies, nei FEROC atveju (50 pav., A). Tačiau, oksiduojant 1,2-propandiolį, matyti, kad daugiausiai deguonies sunaudojama, kai reakcijos metu naudojamas FEROC (50 pav., B). Tai pat iš 50 pav., B matyti, kad sunaudoto deguonies priklausomybės nuo 1,2-propandiolio, naudojant DHDMP⁺ ir ABTS kaip mediatorius, yra panašios.



50 pav. Sunaudoto deguonies priklausomybė nuo glicerolio (A) ir 1,2-propandiolio koncentracijų (B).

Eksperimento salygos: (A-B) - 100 μM FEROC, 100 μM DHDMP⁺, 100 μM ABTS, kitos sąlygos kaip

42 pav.

Pasiūlyta alkoholio oksidacijos katalizuojamos ADH IIG, kai ADH oksiduojantis mediatorius yra regeneruojamas sistema veikia. Tačiau tai tik pradiniai tyrimai ir norint ją pritaikyti praktiškai, reikia atlikti tolimesnius tyrimus, parenkant optimalias sąlygas.

APIBENDRINIMAS

Ištirtas ADH IIG alkoholio dehidrogenazės reakingumas su įvairiais alkoholiais bei skirtingais mediatoriais. Gautos tariamųjų K_M ir V_{max} reikšmės, ir paskaičiuotos katalitinės ir oksidacinės konstantos. Nustatyta, kad geriausias substratas ADH IIG yra 1,2-propandiolis. Pastebėta, kad amino ar kitų grupių įvedimas įtakoja kinetinius parametrus.

Nustatyti alkoholių oksidacijos ir mediatorių redukcijos, katalizuojamos ADH IIG, kinetiniai parametrai. Gautos tariamųjų K_M ir V_{max} reikšmės, ir paskaičiuotos katalitinės ir oksidacinės konstantos. Redukuotos ADH IIG reakcijos su $ABTS^{+}$ oksidacijos konstantų reikšmės didesnės, lyginant su konstantų reikšmėmis gautomis su FERI ir DHDMP⁺.

Ištirtas pH poveikis ADH IIG aktyvumui su skirtingais alkoholiais. Pastebėta, kad pH aktyvumui turi įtakos ne tik buferinio tirpalo pH, bet ir naudojamas mediatorius.

Skirtingais metodais ištirtos L95 katalizuojamos substratų oksidacijos reakcijos pradinio greičio priklausomybės nuo ABTS ir FERO koncentracijų, skirtinguose buferiniuose tirpaluose. Rezultatų analizei pritaikius Michaelio-Menten lygtį, gautos tariamųjų K_M ir V_{max} reikšmės, ir paskaičiuotos katalitinės ir oksidacinės konstantos.

Gautos L95 katalizuojamos ABTS ir FERO oksidacijos reakcijos pradinių greičių priklausomybės nuo buferinių tirpalų pH. Pastebėta, kad reakcijos greitį gali įtakoti ne tik buferinio tirpalo pH, bet ir jo komponentai.

Naudojant deguoninį elektrodą ištirtos deguonies sunaudojimo pradinio reakcijos greičio priklausomybės nuo lakazės, FERO ir ABTS substratų koncentracijų.

Naudojant deguoninį elektrodą tirtas deguonies sunaudojimas vykstant ADH IIG katalizuojamai glicerolio ir 1,2-propandiolio oksidacijai bei L95 lakazės katalizuojamai mediatoriaus (antrojo qADH substrato) regeneracijai. Ištirtos deguonies sunaudojimo priklausomybės nuo glicerolio ir 1,2-propandiolio koncentracijų naudojant skirtingus mediatorius. Pastebėta, kad naudojant FERO kaip antrą substratą su gliceroliu, deguonis nėra iki galo sunaudojama kaip 1,2-propandiolio atveju.

PADĖKA

Šio darbo vadovei Biochemijos instituto Fermentų chemijos skyriaus dr. R. Vidžiūnaitei už kryptingą vadovavimą, konsultacijas ir pagalbą.

Dėkoju Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbuotojoms L. Marcinkevičienei ir I. Bachmatovai už suteiktą galimybę naudoti darbe jų išskirtas ADH IIG alkoholio dehidrogenazę ir L95 lakazę.

Biochemijos instituto Fermentų chemijos skyriaus laboratorijos darbuotojams už visokeriopą pagalbą sprendžiant iškilusius neaiškumus.

Recenzentams VGTU Fundamentinių mokslų fakulteto Chemijos ir bioinžinerijos katedros vedėjui prof., habil. dr. J. Kuliui ir doktorantei R. Ivanec-Goraninai.

LITERATŪRA

1. Afolabi, P. R.; Mohammed, F.; Amaratunga, K.; Majekodunmi, O.; Dales, S. L.; Gill, R.; Thompson, D.; Cooper, J. B.; Wood, S. P.; Goodwin, P. M. and Anthony, C. 2001. Site-directed mutagenesis and X-ray crystallography of the PQQ-containing quinoprotein methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome c (L), *Biochemistry* 40: 9799-9809.
2. Alkoholai [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-20]. Prieiga per internetą: http://www.angelo.edu/faculty/kboudrea/molecule_gallery/05_alcohols/00_alcohols.htm
3. 2 - amino - 1 – feniletanolis [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-22]. Prieiga per internetą: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb9686856.htm
4. 2-amino-1,3-propandiolis [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-22]. Prieiga per internetą: <http://www.chemblink.com/products/534-03-2.htm>
5. 3-amino-1,2-propandiolis [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-22]. Prieiga per internetą: <http://www.chemicaland21.com/lifescience/UH/3-AMINO-1,2-PROPANEDIOL.htm>
6. Andreeben, B. and Steinbucher, A. 2011. Serinol: small molecule - big impact, *AMB Express* 1: 12-18.
7. Anthony, C. 1993. Principles and Applications of Quinoproteins, *Marcel Dekker, New York.*: 17–45.
8. Anthony, C. Ghosh, M. and Blake, C. C. F. 1994. The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrrolo-quinoline quinone, *Biochem. J.* 384: 665-674.
9. Anthony, C. 1996. *Quinoprotein-catalysed reactions*, *Biochem. J.* 32: 697-711.
10. Anthony, C. and Ghosh, M. 1998. The structure and function of the PQQ-containing quinoprotein dehydrogenases, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 69: 1-21.
11. Anthony, C. 2004. The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 428: 2–9.
12. Anthony, C. 2006. Enzymatic analysis using quinoproteins dehydrogenase, *Annals of the New York Academy of Sciences* 501: 283–287.
13. Atsumi, S.; Higashide, W.; Liao, J. C. 2009. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde, *Nature Biotechnology* 27: 1177 – 1180.
14. Bachmatova, I., L. Marcinkevičienė, and R. Meškys. 2004. Alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas putida* HK5: purification and characterization, *Biologija* 2: 89-93.

15. Baldrian, P. 2006. Fungal laccases – occurrence and properties, *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 215–242.
16. Branchi B.; Galli C.; Gentili P. 2005. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase–ABTS oxidations: an apparent paradox, *Org. Biomol. Chem.*, 3: 2604 - 2614.
17. Burton, S. G. 2003. Oxidizing enzymes as biocatalysts, *Trends in Biotechnology* 21:543-549.
18. Bushara K.; Oldstein, S. R.; Grimes, G. J.; Burstein, A. H.; Hallett, M. 2004. Pilot trial of 1-octanol in essential tremor, *Neurology* 62: 122–124.
19. (2S,3S)-(+)-2,3-butandiolis [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-22]. Prieiga per internetą: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=LT&language=lt&productNumber=300349&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F300349%3Flang%3Den>
20. Chastain, G. 2006. Alcohol, neurotransmitter systems, and behavior, *The Journal of general psychology* 133: 329–335.
21. Chen, Z. W.; Matsushita, K.; Yamashita, T.; Fujii, T.; Toyama, H. and Adachi, O. 2002. Structure at 1.9 Å resolution of a quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas putida* HK5, *Structure* 10: 837–849.
22. Chivukula, M.; Spadaro, J. T.; Renganathan, V. 1995. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides, *Biochemistry* 34: 7765–7772.
23. 3-chloro-1,2-propandiolis [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-22]. Prieiga per internetą: <http://chemicaland21.com/lifescience/phar/GLYCEROL%20ALPHAMONOCHLOROXYDRI N.htm>
24. Cho, N-S.; Cho, N-Y.; Shin, S-J.; Choi, Y-J.; Leonowicz, A. and Ohga, S. 2008. Production of Fungal Laccase and Its Immobilization and Stability, *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 53: 13-18.
25. Courcy B., Gresh, N. and Piquemal, J. P. 2009. Importance of Lone Pair Interactions/Redistribution in Hard and Soft Ligands within the Active Site of Alcohol Dehydrogenase Zn-metalloenzyme: Insights from Electron Localization Function, *Interdiscip Sci Comput Life Sci* 1: 55-60.
26. Datta, S.; Mori, Y.; Takagi, K.; Kawaguchi, K.; Chen, Z-W.; Okajima, T.; Kuroda, S.; Ikeda, T.; Kano, K. Tanizawa K. and Mathews, F. S. 2001. Structure of a quinoxinoprotein amine

- dehydrogenase with an uncommon redox cofactor and highly unusual crosslinking, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14268–14273.
27. De Jong, G. A. H.; Caldeira, J.; Sun, J.; Jongejan, J. A.; de Vries, S.; Loehr, T. M.; Moura, I.; Moura, J. J. G.; Duine, J.A. 1995. Characterization of the interaction between PQQ and heme C in the quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *Biochemistry* 34, 9451-9458.
 28. Desai, S. S. and Nityanand C. 2011. Microbial Lacases and their Applications: A Review, *Asian J. Biotechnol.* 3: 98-124.
 29. Dianhidro-D-glicitolas [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-21]. Prieiga per internetą: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=LT&language=lt&productNumber=329207&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2FALDRICH%2F329207%3Flang%3Den>
 30. 1,4:3,6-Dianhidro-D-mannitolas [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-21]. Prieiga per internetą: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=LT&language=lt&productNumber=329266&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2FALDRICH%2F329266%3Flang%3Den>
 31. 5,10-dihidro-5,10-dimetilfenazinas [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-25]. Prieiga per internetą: <http://www.guidechem.com/cas-636/63631-49-2.html>
 32. Dokter, P.; Frank, J. and Duine, J. A. 1986. Purification and characterization of quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* L.M.D. 79.41, *Biochem. J.* 239: 163-167.
 33. Dubinin, A. G., Li, F., Li, Y., Yu, J. 1991. A solid state immobilized enzyme polymer membrane microelectrode for measuring lactate ion concentration, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 25: 131–135.
 34. Enguita, F. J.; Martins, L. O.; Henriques, A. O. and Carrondo, M. A. 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties, *J. Biol. Chem.* 278: 19416-19425.
 35. Enguita, F. J., Marçal, D.; Martins, L. O.; Grenh, R.; Henriques, A. O.; Lindley, P. F. and Carrondo, M. A. 2004. Substrate and Dioxygen Binding to the Endospore Coat Laccase from *Bacillus subtilis*, *The journal of biological chemistry* 279: 23472–23476.
 36. Etanolis [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-23]. Prieiga per internetą: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol>

37. Fabbrini, M.; Galli C, Gentili P. *et al.* 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase, *J. Mol. Cat. B. Enzym.* 16: 231-240.
38. Farhangrazi, Z. S.; Copeland, B. R.; Nakayama, T.; Amachi, T.; Yamazaki, I.; Powers, L. S. 1994. Oxidation-reduction properties of compound I and II of *Arthromyces ramosus* peroxidase, *Biochemistry* 33: 5647-52.
39. Fericianidas [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-20]. Prieiga per internetą: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ferricyanide>
40. Ferraroni, M., Myasoedova N.; Schmatchenko V.; Leontievsky A.A.; Golovleva L.A.; Scozzafava A. and Briganti F. 2007. Crystal structure of a blue laccase from *Letinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases, *BMC structural Biology* 7: 60-72.
41. Frebortova, J.; Matsushita, K.; Yakushi, H.; Toyama, H., and Adachi, O. 1997. Quinoprotein alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: kinetic study on the enzyme purified from *Acetobacter methanolicus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 459–465.
42. Garavaglia, S.; Cambria, M. T.; Miglio, M.; Ragusa, S.; Iacobazzi, V.; Palmieri, F.; D'Ambrosio, C.; Scaloni, A. and Rizzi, M. 2004. The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair, *J. Mol. Biol.* 342: 1519-1531.
43. Giardina, P.; Farako, V.; Pezzella, C.; Piscitelli, A. ; Vanhulle, S. and Sannia, G. 2010. Laccases: a never-ending story, *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 369-385.
44. Glicerolis [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-22]. Prieiga per internetą: <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol>
45. Goffin, P.; Lorquet, F.; Kleerebezem, M. and Hols, P. 2004. Major Role of NAD-Dependent Lactate Dehydrogenases in Aerobic Lactate Utilization in *Lactobacillus plantarum* during Early Stationary Phase, *Journal of Bacteriology* 86: 6661–6666.
46. Gomez-Manzo, S. Arreguin-Espinosa, R. Contreras-Zentella, M. y Escamilla-Marvan, E. 2005. Las Quinoproteinas Alcohol Deshidrogenasa en los sistemas bacterianos: distribution, clasification, estructura y function, *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 8: 28-37.
47. Gorisch, H. and Rupp, M. 1989. Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas*, *Kluwer Academic Publishers, Dordreeth*: 23-34.

48. Hakulinen, N.; Kiiskinen, L-L.; Kruus, K.; Saloheimo, M.; Paananen, A.; Koivula, A. and Rouvinen, J. 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site, *Nature Structural Biology* 9: 601-605.
49. Hamada, H. 2009. *In Vitro* Inhibition Studies of Human Class II Alcohol Dehydrogenase, *Master of Science Thesis*: 1-40.
50. Harper, C. J.; Hayward, D.; Kidd, M.; Wiid, I. and Helden, P. 2010. Research article Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase are regulated in response to nitrogen availability in *Mycobacterium smegmatis*, *BMC Microbiology* 10: 138-150.
51. Hellgren, M. 2009. Enzymatic studies of alcohol dehydrogenase by a combination of in vitro and in silico methods, *Ph.D. thesis, Stockholm, Sweden: Karolinska Institutet*: 1-70.
52. Hopper, D. J. and Rogozinski, J. 1998. Redox potential of the haem c group in the quinocytochrome, lupanine hydroxylase, an enzyme located in the periplasm of a *Pseudomonas* sp., *Biochim. Biophys. Acta* 1383: 160-164.
53. Hopper, D. J.; Kaderbhai, M. A.; Marriott, S. A.; Young, M. and Rogozinski, J. 2002. Cloning, sequencing and heterologous expression of the gene for lupanine hydroxylase, a quinocytochrome c from a *Pseudomonas* sp., *Biochem. J.* 367: 483-489.
54. Izobutanolis [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-23]. Prieiga per internetą: <http://en.wikipedia.org/wiki/Isobutanol>
55. Jaeger, K. E. 2004. Protein technologies and commercial enzymes: White is the hype-biocatalysts on the move, *Current Opinion in Biotechnology* 15:269-271.
56. Jongejan, A.; Jongejan, J. A. and Duine, J. A. 1998. Homology model of the quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*, *Protein Engineering* 11: 185–198.
57. Jorvall, H. 1977. The Primary Structure of Yeast Alcohol Dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 72: 425-442.
58. Jordan, J. 2005. Isolation and Characterization of a Novel Thermostable and Catalytically Efficient Laccase from *Peniophora* sp., *Strain UD4*: 1-189.
59. Kasahara, T. and Tadafumi, K. A. 2003. A new redox cofactor vitamin for mammals, *Nature*. 422: 10-12.
60. Kay, Ch. W. M.; Mennenga, B.; Gorisch, H. and Bittl, R. 2006. Substrate binding in quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* studied by electron-nuclear double resonance, *The National Academy of Sciences of the USA* 103: 5267–5272.

61. Kiiskinen, L-L. 2004. Characterization and heterologous production of a novel laccase from *Melanocarpus albomyces*, *VTT Biotechnology* 556: 1-140.
62. Kondo, K. and Horinouchi, S. 1997. Characterization of the genes encoding the three component membrane bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurians*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1131- 1138.
63. Kulys, J.; Palaima, A.; Urbelis, G. 1998. Employing heterocyclic dihydropolyazines for amperometric glucose sensing, *Anal. Lett.* 31: 569-584.
64. Kulys J.; Krikstopaitis K.; Ziemys A. 2000. Kinetics and thermodynamics of peroxidase- and laccase-catalyzed oxidation of N-substituted phenothiazines and phenoxazines, *JBIC* 5: 333-340.
65. Kunamneni, A.; Ballesteros, A.; Plou, F. J. and Alcalde, M. 2007. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications, *Microbiology* 1: 233-245.
66. Kunamneni, A.; Plou, F. J.; Ballesteros, A. and Alcalde, M. 2008. Laccases and Their Applications: A Patent Review, *Recent Patents on Biotechnology* 2: 10-24.
67. Kuravsky, M.; Aleshin, V. V.; Frishman, D. and Muronetz, V. I. 2011. Testis-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: origin and evolution, *BMC Evolutionary Biology* 11: 160-175.
68. Leblova, S.; Perglerova, E. and Hlochova, J. 1977. Comparative study of plant alcohol dehydrogenases, *Biologia Plantarum* 19: 88-95.
69. Lee, Y.; Yoon, J. and Gunten, U. 2005. Spectrophotometric determination of ferrate (Fe(VI)) in water by ABTS, *Water Research*, 39: 1946-1953.
70. Logsdon, J. E. and Loke, R. A. 2000. Isopropyl Alcohol, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, December 4.
71. Marcinkevičienė, L., Bachmatova, I. ir Meškys, R. 2006. Stability, activity and substrate specificity of alcohol dehydrogenases in media containing organic solvents, *Biologija* 3: 38–42.
72. Matsushita, K.; Yakushi, T.; Toyama, H.; Shinagawa, E. and Adachi, O. 1996. Function of multiple heme C moieties in intramolecular electron transport and ubiquinone reduction in the quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase cytochrome c complex of *Gluconobacter suboxydans*, *J. Biol. Chem.* 271: 4850-4857.
73. Mayer, A. M.; Staples, R. C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme, *Phytochemistry* 60: 551–565.

74. Morozova, O. V.; Shumakovich, G. P.; Gorbacheva, S. V., Shleev, S. V. and Yaropolov, A. I. 2007. „Blue „, Laccases, *Biochemistry* 72: 1136-1150.
75. Munro, A. W.; Taylor, P. and Walkinshaw, M. D. 2000. Structures of redox enzymes, *Current Opinion in Biotechnology* 11:369–376.
76. Negm, F. B. and Loescher, W. H. 1979. Detection and Characterization of Sorbitol Dehydrogenase from Apple Callus Tissue, *Plant Physiol.* 64: 69-73.
77. Nelson, D. P.; Kiesow, L. A. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV), *Analytical Biochemistry* 49:474-478.
78. Ohanes C.; Majcherczyk A. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems, *Applied and Environmental Microbiology* 66: 524–528.
79. 1-oktanolis [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-23]. Prieiga per internetą: <http://en.wikipedia.org/wiki/Octanol>
80. Oubrie, A.; Rozeboom, H. J.; Kalk, K. H.; Olsthoorn, A. J. J.; Duine, J. A. and Dijkstra, B. W. 1999. Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase, *The EMBO Journal* 18: 5187–5194.
81. Oubrie, A.; Rozeboom, H. J. and Kalk, K. H. 1999. The 1.7 Å Crystal Structure of the Apo Form of the Soluble Quinoprotein Glucose Dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* Reveals a Novel Internal Conserved Sequence Repeat, *Journal of Molecular Biology* 289: 319-333.
82. Oubrie, A. and Dijkstra, B. W. 2000. Structural requirements of pyrroloquinoline quinine dependent enzymatic reactions, *Protein Science* 9: 1265–1273.
83. Piontek, K. Antorini, M. and Choinowski, T. 2002. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers, *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 37663–37669.
84. Prasmickaitė, L.; Engesæter, B.; Skrbo, N.; Hellenes, T.; Kristian, A.; Oliver, N. K.; Suo, Z. and Mælandsmo, G. M. 2010. Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Activity Does Not Select for Cells with Enhanced Aggressive Properties in Malignant Melanoma, *PLoS ONE* 5: 10731-10743.
85. 1,2-propandiolis [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-22]. Prieiga per internetą: http://en.wikipedia.org/wiki/Propylene_glycol

86. 2-propanolis [interaktyvus]. [žiūrėta 2012-04-23]. Prieiga per internetą: http://en.wikipedia.org/wiki/Isopropyl_alcohol
87. Quintanar, L.; Yoon, J.; Aznar, C. P.; Palmer, A. E.; Andersson, K. K.; Britt, R. D. and Solomon, E. I. 2005. Spectroscopic and electronic structure studies of the trinuclear Cu cluster active site of the multicopper oxidase laccase: nature of its coordination unsaturation, *J. Am. Chem. Soc.* 127: 13832-13845.
88. Riva, S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry, *Trends In Biotechnology* 24: 219-226.
89. Saab-Rincón, G. and Valderrama, B. 2009. Protein Engineering of Redox-Active Enzymes, *Antioxidants and Redox Signaling* 11: 167-192.
90. Satoh, A.; Kim, J-K.; Miyahara, I.; Devreese, B.; Vandenberghe, I.; Hacısalıhoğlu, A.; Okajima, T.; Kuroda, S.; Adachi, O.; Duine, J. A.; Beeumen, J.; Tanizawa, K. and Hirotsu, K. 2002. Crystal structure of quinoxinoprotein amine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*, *Biol. Chem.* 277: 2830–2834.
91. Schellenberg, K. A.; Hellerman, L. 1958. Oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide, *J. Biol. Chem.* 231: 547–556.
92. Stites, T. E.; Mitchell, A. E. and Rucker, R. B. 2000. Physiological Importance of Quinoxinoproteins and the O-Quinoxin Family of Cofactors, *The American Society for Nutritional Sciences* 130: 719-726.
93. Sun, H-W. and Plapp, B. V. 1992. Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family, *J. Mol. Evol.* 34: 522-535.
94. Tachibana, S.; Kuba, N.; Kawai, F.; Duine, J. A. and Yasuda, M. 2003. Involvement of a quinoxinoprotein (PQQ-containing) alcohol dehydrogenase in the degradation of polypropylene glycols by the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*, *FEMS Microbiology Letters*. 218: 345-349.
95. Theorell, H., McKee, J. S. 1961. Mechanism of action of liver alcohol dehydrogenase, *Nature* 192: 47–50.
96. Thurner, C.; Vela, C.; Thöny-Meyer, L.; Meile, L. and Teuber, M. 1997. Biochemical and genetic characterization of the acetaldehyde dehydrogenase complex from *Acetobacter europaeus*, *Arch Microbiol.* 168: 81-91.

97. Tishkov, V. I. and Popov, V. O. 2004. Catalytic Mechanism and Application of Formate Dehydrogenase, *Biochemistry* 69: 1537-1554.
98. Toyama, H., Fujii, A.; Matsushita, K.; Shinagawa, E.; Ameyama, M. and Adachi, O. 1995. Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenase are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols, *J. Bacteriol.* 177: 2442-2450.
99. Toyama, H.; Mathews, F. S.; Adachi, O. and Matsushita K. 2004. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 428: 10-21.
100. Toyama, H.; Chen, Z-W; Fukumoto, M.; Adachi, O.; Matsushita K. and F. Scott Mathews. 2005. Molecular Cloning and Structural Analysis of Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase ADH-IIG from *Pseudomonas putida* HK5, *J. Mol. Biol.* 352: 91-104.
101. Vangnai, A. S., Arp, D. J. and Sayavedra-Soto, L. A. 2002. Two Distinct Alcohol Dehydrogenases Participate in Butane Metabolism by *Pseudomonas butanovora*, *J. Bacteriol.* 184: 1916–1924.
102. Vangnai, A. S., Sayavedra-Soto, L. A., Arp, D. J. 2002. Roles for the Two 1-Butanol Dehydrogenases of *Pseudomonas butanovora* in Butane and 1-Butanol Metabolism, *J. Bacteriol.* 184: 4343–4350.
103. Villañio, D.; Fernández-Pachón, M. S.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C. 2004. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS^{•+} method: influence of sample dilution and time, *Talanta*, 64: 501–509.
104. Viswanath, B., *et al.* 2008. Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications with Special Reference to Bioremediation, *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* 2: 1-13.
105. Widsten P.; Kandelbauer A. 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review, *Enzyme and Microbial Technology* 42: 293–307.
106. Xu, F. 2005. Application of oxidoreductases: Recent progress, *Industrial Biotechnology* 1:38–50.
107. Ащмарин, И. П. 2003. Алкогольдегидрогеназа млекопитающих – объект молекулярной медицины, *Успехи биологической химии* 43: 3-18.
108. Куликова, Н. А.; Кляйн, О. И.; Степанова, Е. В. и Королёва, О. В. 2011. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов:

фундаментальные и прикладные аспекты (обзор), *Прикладная биохимия и микробиология*, 6: 619–634.

109. Шлеев, С. В. Зайцева Е.А., Горшина Е. С., Морозова О. В., Сереженков В. А., Бурбаев Д. Ш., Кузнецов Б. А., Ярополов А. И. `2003. Спектральное и электрохимическое изучение лакказ базидиальных грибов, *Химия* 44: 35-39.