

Lakaza jako użyteczne narzędzie biotechnologiczne w syntezie związków aktywnych biologicznie

STRESZCZENIE

Synteza związków organicznych z zastosowaniem enzymów oksydoredukcyjnych jako biokatalizatorów reakcji jest coraz częściej rozpatrywana jako przyjazna środowisku alternatywa dla klasycznej syntezy chemicznej. Przykładem takiego enzymu, który wykazuje niską specyficzność substratową i działa w łagodnych warunkach pH, ciśnienia i temperatury, jest lakaza, uniwersalna oksydaza fenolowa, wykorzystująca tlen jako naturalny ko-substrat reakcji. Może ona utleniać zarówno pochodne fenolowe jak i aminy aromatyczne, które w reakcjach homo- lub heterocząsteczkowych są sprzęgane w nowe związki organiczne o unikalnych właściwościach i zastosowaniu, również jako cząsteczki aktywne biologicznie. Wśród wielu substancji bioaktywnych otrzymanych na drodze biokatalizy można wyróżnić substancje o aktywności antyoksydacyjnej, przeciwnowotworowej, przeciwzapalnej i przeciwdrobnoustrojowej. Szczególnie te ostatnie są bardzo cenne w kontekście poszukiwania nowych związków terapeutycznych, które mogą pokonać zjawisko lekooporności bakterii.

WPROWADZENIE

Naturalne związki bioaktywne są produktami metabolizmu wtórnego roślin, bakterii i grzybów, a ich główną funkcją jest obrona przed szkodliwym działaniem czynników środowiskowych oraz patogenów. Z uwagi na prozdrowotne działanie na organizm człowieka, związki bioaktywne możemy podzielić na polifenole o właściwościach antyoksydacyjnych, witaminy, probiotyki i prebiotyki, fitosterole, alkaloidy, barwniki oraz farmaceutyki, które mogą być dostarczane wraz z pożywieniem, w sposób niezamierzony lub celowy. Metody pozyskiwania związków bioaktywnych są dopasowane do organizmu, który je wytwarza. W przypadku metabolitów roślin obejmują np. macerację lub ekstrakcję [1]. W przypadku metabolitów wtórnych produkowanych przez bakterie i grzyby, są one pozyskiwane np. z płynu pochodzącego z kultur zawiesinowych, następnie ekstrahowane i oczyszczane [2]. Niektóre z nich, zwłaszcza te o działaniu terapeutycznym, mogą być syntetyzowane w wieloetapowych procesach chemicznych, które zostały opracowane na wzór naturalnych procesów biochemicznych, ale niestety niosą ze sobą poważne obciążenia środowiskowe [3]. Z tego powodu coraz częściej naukowcy opracowują technologie syntezy znanych lub nowych związków aktywnych biologicznie oparte o procesy tzw. białej biotechnologii. Taką szansę daje biokataliza enzymatyczna z zastosowaniem enzymów z klasy oksydoreduktaz, która coraz częściej jest rozpatrywana jako bezpieczna dla środowiska alternatywa dla szkodliwej syntezy organicznej. Synteza z udziałem enzymów nie wymaga użycia toksycznych związków sprzęgających i utleniających oraz skrajnych warunków temperatury i środowiska reakcji, często obejmuje dużo mniejszą ilość etapów konieczną do wytworzenia wartościowego i bezpiecznego produktu końcowego. Spośród oksydoreduktaz na szczególną uwagę zasługuje lakaza, która charakteryzuje się szerokim spektrum substratowym, przez co stanowi doskonałe narzędzie biotechnologiczne. Reakcje utleniania katalizowane przez lakazę mogą obejmować jednoetapowe reakcje syntezy związków organicznych stanowić jeden z etapów w nowo zaprojektowanych procesach wieloenzymatycznych albo być biologicznym komponentem w reakcjach chemoenzymatycznych [4-5]. W takich procesach lakaza katalizuje biotransformację różnych prekursorów organicznych a produktami reakcji są związki o zróżnicowanej strukturze od dimerów, oligomerów i polimerów, po związki heterocykliczne o szerokim spektrum właściwości i zastosowań [6-7]. Lakaza katalizuje reakcje biosyntezy wielu użytecznych produktów np. biomateriałów, polimerów i barwników oraz nowych substancji bioaktywnych o potencjalnej aktywności przeciwzapalnej, przeciwdrobnoustrojowej, antyoksydacyjnej i przeciwnowotworowej [5-9]. Oprócz syntezy organicznej związków użytecznych lakaza degraduje lub polimeryzuje związki niebezpieczne dla środowiska, dzięki czemu może znaleźć zastosowanie w bioremediacji wód, ścieków i gleby z zanieczyszczeń organicznych [10].

dr hab. Jolanta Polak ✉

Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

https://doi.org/10.18388/pb.2017_624

✉ autor korespondujący: jolanta.polak@mail.umcs.pl

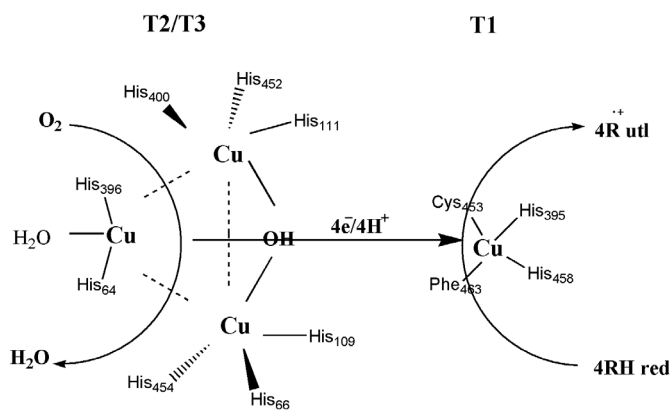
Słowa kluczowe: lakaza, biokataliza, związki bioaktywne, biotransformacja, reakcje sprzęgania

Wykaz stosowanych skrótów: ABTS – kwas 2,2'-azino-bis(3-etylo-6-benzotiazolinosulfonowy); DDQ – 2,3-dichloro-5,6-dicyjano-p-benzochinon; DES – rozpuszczalniki głęboko eutektyczne (ang. *deep eutectic solvents*); DIR – białka kierujące (ang. *dirigent protein*); HBT – hydroksybenzotriazol; LAK – lakaza; LMS – system lakaza-mediator (ang. *laccase-mediator system*); TEMPO – N-oksylotetrametylopiperydyna (ang. *tetramethylpiperidine N-oxyl*)

WYSTĘPOWANIE, BUDOWA I FUNKCJA LAKAZY

Lakaza (EC 1.10.3.2, benzodiol: O₂ oksydoreduktaza) należy do oksydaz szeroko rozpowszechnionych w świecie roślin, grzybów, bakterii oraz niektórych owadów [11-14]. Po raz pierwszy została wyizolowana przez Yoshidę w roku 1883 z soku drzewa lakowego *Toxicodendron vernicifluum* [15]. Naturalna funkcja lakazy zależy od jej źródła i obejmuje głównie reakcje anaboliczne towarzyszące procesom wzrostu i rozwoju organizmów. Przykładem są reakcje utleniania fenoli i ich pochodnych związane z lignifikacją i patogenezą u roślin, morfogenezą i sporulacją bakterii, pigmentacją i sklerotyzacją kutykuli owadów, a także morfogenezą, pigmentacją i sporulacją grzybów [11-14]. Do naturalnych funkcji lakaz należy również udział w reakcjach katabolicznych, wśród których prym wiodzie lakaza syntetyzowana przez grzyby należące do typu Basidiomycota, Ascomycota oraz Deuteromycota, która razem z innymi enzymami jest odpowiedzialna za depolimeryzację lignocelulozy [12]. Zarówno lakazy roślinne jak i lakazy grzybowe występują w formie glikozylowanej (cukry stanowią odpowiednio 22-45% i 10-25% masy cząsteczki), co sprawia, że są one wyjątkowo odporne na działanie wysokiej temperatury lub obecności rozpuszczalników organicznych. Lakazy grzybowe występują w sekretach grzybów należących do ekologicznej grupy białej zgnilizny drewna, przez co mogą być pozyskiwane w dużej ilości w prosty i ekonomiczny sposób [16].

Lakaza należy do oksydaz wielomiedziowych i zawiera w centrum katalitycznym cztery atomy miedzi (II), reprezentujące trzy typy (T1, T2, T3) różniące się właściwościami spektroskopowymi oraz pełnioną funkcją (Ryc. 1) [10,12]. Atom miedzi typu 1 (T1) jest odpowiedzialny za wiązanie i utlenianie substratu, a także wykazuje bardzo intensywne niebieskie optyczne pasmo absorpcji przy długości fali $\lambda \approx 610$ nm oraz stałe wartości parametrów EPR niezależnie od źródła lakazy. Oprócz atomu miedzi T1, w centrum aktywnym lakazy występuje atom miedzi typu 2 (T2) oraz dwa atomy miedzi typu 3 (T3), tworzące trójatomowy zespół T2/T3, odpowiedzialny za wiązanie i redukcję tlenu cząsteczkowego do wody [17]. Atom miedzi T1, w odróżnieniu od właściwości spektroskopowych i elektronowych, które są wspólne dla lakaz oraz innych białek miedziowych, wpływa na różną wartość potencjału oksydoredukcyjnego



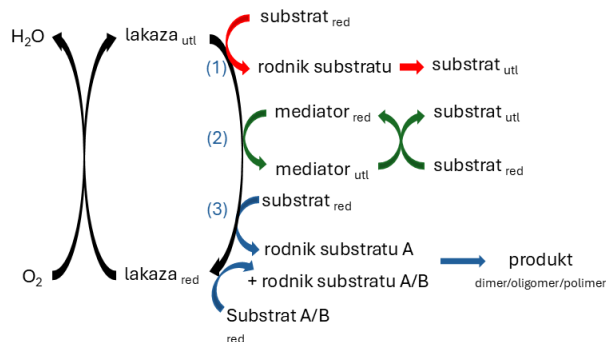
Rycina 1. Centrum aktywne lakazy (na podstawie [12]).

(E^0) w zależności od źródła lakazy [18]. Jest to podstawą podziału lakaz na enzymy nisko- (od 400 do 550 mV) oraz wysokopotencjałowe (od 700 do 800 mV). Przykładem lakaz o niskim potencjale oksydoredukcyjnym są głównie lakazy bakteryjne i roślinne jak np. lakaza wyizolowana z *Rhus vernicifera* o wartości potencjału E^0 wynoszącym 410 mV (vs. NEW) [17]. Lakazami o wysokim potencjale są przede wszystkim lakazy grzybowe, dla których wartość potencjału E^0 wynosi nawet 800 mV (vs. NEW), tak jak w przypadku lakaz wytwarzanych przez rodzaj *Trametes* [18,19]. W reakcjach katalizowanych przez lakazę wartość potencjału redoks znacząco wpływa na jej właściwości katalityczne. Wraz z jego wzrostem rośnie liczba potencjalnych substratów dla lakaz oraz zwiększa się jej wydajność katalityczna [19]. Dlatego lakazy grzybowe mogą utleniać szerokie spektrum substratów organicznych, od naturalnych fenoli po aminy i związki heterocykliczne [4].

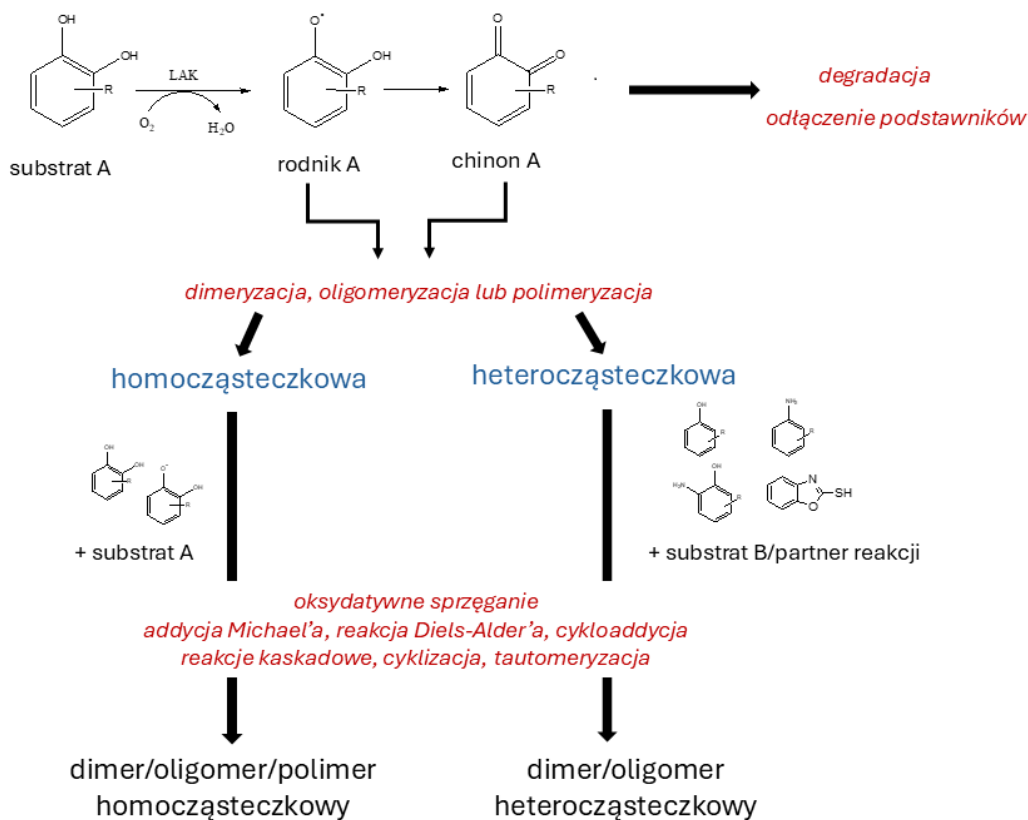
RODZAJE REAKCJI KATALIZOWANYCH PRZEZ LAKAZĘ

Reakcje katalizowane przez lakazy można podzielić na trzy podstawowe typy, które wynikają ze struktury i potencjału redoks przekształcanego substratu organicznego (Ryc. 2).

Pierwszym typem (1) jest bezpośrednie utlenianie substratów wykazujących niski potencjał redoks, którymi są naturalne substraty lakazy tj. związki fenolowe i ich pochodne zawierające aminowe, metoksyłowe, karboksylowe i sulfonowe grupy funkcyjne [19]. Podczas utleniania pochodnych fenoli podstawnik hydroksylowy ulega deprotonacji, w wyniku czego powstają bardzo reaktywne rodniki fenoksyłowe, które następnie przekształcają się do formy chinonu, tj. utlenionej postaci substratu fenolowego lub biorą udział w reakcji sprzęgania z innymi substratami. **Drugim typem reakcji (2)** jest utlenianie substratów za pomocą mediatorów reakcji (LMS), do których zalicza się małe cząsteczki organiczne, takie jak ABTS, HBT lub TEMPO, które pośredniczą w przekazywaniu elektronów z substratu na tlen. W rzeczywistości, te cząsteczki są łatwo utleniane przez lakazę do rodników o wysokim potencjale redoks; które mogą dyfundować z dala od centrum aktywnego enzymu. Umożliwia to utlenianie substratów o strukturze polimerowej, które nie mogą penetrować centrum aktywnego lakazy jak np. cząsteczka ligniny, lub substratów o bardzo wysokim potencja-



Rycina 2. Typy reakcji katalizowanych przez lakazę. Przedstawiono podział ze względu na potencjał redoks substratów: bezpośrednie (kolor czerwony), z udziałem mediatora (kolor zielony) oraz reakcje sprzęgania (kolor niebieski).



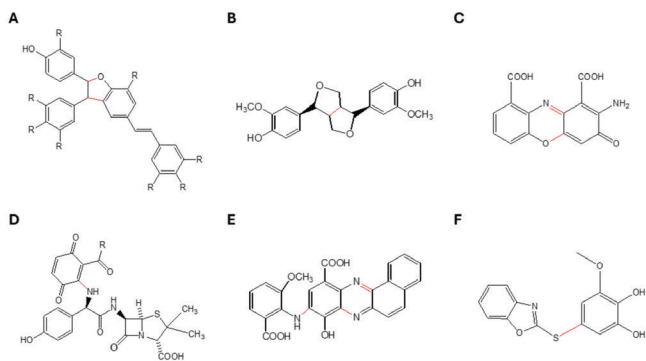
Rycina 3. Rodzaje przekształceń rodników w reakcjach katalizowanych przez lakazę.

le redoks, takich jak alkohole alifatyczne, benzylowe i allilowe oraz niektóre związki heterocykliczne [20,21]. **Trzecim typem (3)** są reakcje, obejmujące przekształcenia rodników, które powstają w wyniku bezpośredniego utlenienia substratu fenolowego lub niefenolowego przez lakazę. Takie rodniki są bardzo reaktywne i mogą być sprzęgane ze sobą w reakcjach homocząsteczkowych lub z innymi związkami organicznymi w reakcjach heterocząsteczkowych (Ryc. 3). Produktami sprzęgania są dimery, oligomery lub nawet polimery a proces ten, który zachodzi nieenzymatycznie i czę-

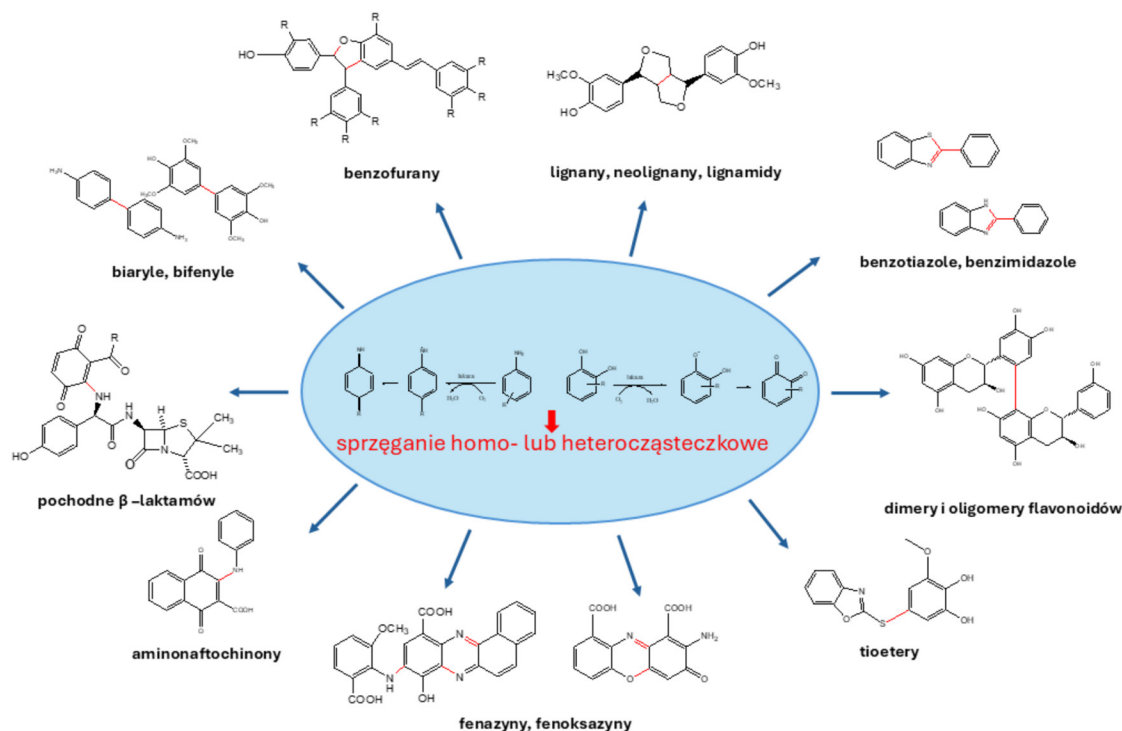
sto spontanicznie, zależy od liczby i rodzaju podstawników, obecności rozpuszczalników oraz czasu reakcji [6].

Podczas nieenzymatycznego sprzęgania i rearanżacji wewnątrzcząsteczkowych rodników i związków pośrednich dochodzi do wytworzenia nowych wiązań chemicznych, które są uwarunkowane budową substratów, a w szczególności położeniem i rodzajem podstawników podatnych na atak lakazy i aktywujących pierścieni aromatyczny, tj. hydroksylowych, aminowych i metoksyowych [6,9]. W reakcjach sprzęgania homocząsteczkowego fenoli i ich pochodnych są nimi przede wszystkim wiązania typu węgiel-węgiel (C-C, C=C) i węgiel-tlen (C-O), które łączą substraty w dimery, oligomery lub nawet polimery. W niektórych przypadkach może dochodzić do cyklizacji z wytworzeniem struktury charakterystycznej dla lignanu i benzofuranu (Ryc. 4A, 4B). Jeśli substrat reakcji zawiera dodatkowo podstawnik aminowy może dochodzić do sprzęgania jego rodników poprzez nowo wytworzone wiązania typu węgiel-azot (C-N, C=N), a towarzyszące cyklizacja (powstanie wiązania C-O-C) i rearanżacja wewnątrzcząsteczkowa prowadzą do powstania związków heterocyklicznych o strukturze np. fenazyń i fenoksazyń (Ryc. 4C) [7,22].

Na szczególną uwagę zasługują reakcje sprzęgania heterocząsteczkowego, które umożliwiają tworzenie nowych związków hybrydowych z substratów o niskim potencjale redoks, jak również enzymatyczne sprzęganie ze związkami, które np. ze względu na zbyt wysoki potencjał redoks nie mogą być bezpośrednio utleniane przez lakazę.



Rycina 4. Rodzaje nowowytworzonych wiązań. Przedstawiono wiązania typu C-C, C-O, C-N, C=N oraz S-C (na czerwono) w związkach bioaktywnych otrzymanych w wyniku lakazowej transformacji homocząsteczkowej (związki A, B i C) i heterocząsteczkowej (związki D, E i F); A - dehydrodimer pochodnych rezweratrolu, B - pinorezinoł, C - pochodna fenoksazyń, D - pochodna amoksyliny, E - pochodna fenazyń, F - tioeter.



Rycina 5. Przykładowe rodzaje struktur chemicznych związków aktywnie biologicznie otrzymane przy udziale lakazy.

W obecności łatwo utlenianych substratów stają się one partnerami reakcji, a produkty sprzężenia obu związków charakteryzują się często unikatową strukturą i właściwościami bioaktywnymi (Ryc. 4D, 4E i 4F). Również w reakcjach heterocząsteczkowych katalizowanych przez lakazę struktura substratów warunkuje rodzaj nowo tworzonych wiązań. Wśród najczęściej opisywanych są wiązania typu

Tabela 1. Główne właściwości bioaktywne produktów otrzymanych przy udziale lakazy.

L.p.	Aktywność biologiczna produktów reakcji	Akronim bioaktywności
1	przeciwbakteryjna	PB
2	przeciwnowotworowa	PN
3	antyoksydacyjna	A
4	przeciwzapalna	PZ
5	przeciwnaczyniotwórcza	PNT
6	cytotoksyczna/cytostatyczna	CT
7	przeciwgrzybicza	PG
8	przeciwbiegunkowa	PB
9	antyproliferacyjna	AP
10	aktywator białek hsp90	AB
11	przeciwpierwotniakowa	PP
12	przeciwvirusowa	PW
13	hepatoprotekcyjna	HP
14	przeciwmigrenowe	PM

węgiel azot (C-N i C=N) obecne w bioaktywnych produktach sprzężenia pochodnych amin aromatycznych z innymi aminami lub fenolami [23]. Przykładem są nowe pochodne penicylin (Ryc. 4D) otrzymane w reakcji ich sprzężenia z pochodnymi kwasu 2,5-dihydroksybenzoesowego poprzez nowo wytworzone wiązania C-N [24]. Tak jak w przypadku reakcji homocząsteczkowych, oprócz dimeryzacji lub oligomeryzacji heterocząsteczkowej substratów zawierających podstawnik aminowy, może dochodzić do cyklokondensacji z wytworzeniem heterocyklicznych związków bioaktywnych, których struktura chemiczna oparta jest o azot [7]. Przykładem takich produktów są fenazy, a także benzimidazole i benzotiazole (Ryc. 4E) [25,26]. W przypadku substratów siarkowych odnotowano, że proces sprzężenia heterocząsteczkowego 2-merkaptobenzotiazoli z pochodnymi katecholu do struktury tioeterów zachodzi poprzez nowe wiązanie typu węgiel-siarka (C-S) (Ryc. 4F) [27].

Nieenzymatycznemu oksydatywnemu sprzężeniu wysocze reaktywnych rodników w dimery lub oligomery często towarzyszą inne reakcje, które odgrywają rolę w formowaniu stabilnego, ostatecznego produktu lub produktów reakcji (Ryc. 3). Reakcjami odnotowanymi podczas ich przekształceń są: addycja Michaela, reakcja Diels-Aldera, cyklizacja, reakcje kaskadowe oraz tautomeryzacja [4,5]. Mechanizmem dość często opisywanym w reakcjach lakazowych jest addycja Michaela. Zakłada ona powstanie rodników kationowych, które następnie reagują z grupą aminową partnera reakcji poprzez addycję nukleofilową, prowadząc do wytworzenia wiązań typu C-N [28]. Przykładem takiej reakcji jest synteza bioaktywnych aminochinonów lub nowych penicylin w wyniku addycji pierwszorzędowych

Tabela 2a. Przykłady produktów bioaktywnych otrzymanych w wyniku modyfikacji substratów naturalnych przez lakazę.

Substrat (-y)	Produkt (-y)		Źródło lakazy / obecność rozpuszczalnika, mediatora i/lub białek	Piśmiennictwo
	rodzaj	aktywność biologiczna		
hydroksytyrozol	dimery, oligomery i polimery hydroksytyrozolu	A	<i>TpL</i>	[36]
sezamol	trimer sezamolu	A	<i>TvL</i>	[37]
2,6-dimetoksyfenol (syringol)	dimery biarylowe typu C-C	A	<i>TpL</i> ; <i>BcL</i>	[38,39]
kwas kawowy	8-8' dimer kwasu kawowego o strukturze lignanu	A	<i>Scl</i> /EA	[40]
pochodne rezweratrolu	dehidrodimery rezweratrolu o strukturze benzofuranu	PN, AP	<i>TvL</i> /EA	[41]
pochodne <i>trans</i> rezweratrolu	dimery hydroksystilbenu/2,3-diarylobenzo[b]furany	A	<i>TvL</i> /EA, DDQ	[42]
eugenol	pinorezynol	A, PN, PZ, PG, PW	<i>CgL</i> / <i>PsVAO</i>	[43,44]
alkohol koniferylowy	analogi pinorezinolu	A, PN, PZ, PG, PW	<i>TvL</i> / <i>PhDIR</i>	[45]
alkohol koniferylowy	karpanon	PZ, HP	<i>TvL</i> / <i>PhDIR</i>	[45]
(<i>E</i> -)-2-propenylosezamol	karpanon	PZ, HP	<i>TvL</i> /A	[46]
kwas ferulowy	2,3-dihydrobenzofuran	A, PNT	<i>TpL</i>	[47]
estry kwasu ferulowego	dihydrobenzofurany	A	<i>AbL</i>	[48]
(<i>E</i>)-4-styrylofenol	<i>trans</i> -dihydrobenzofurany	AB	<i>TvL</i> /A	[49]

PsVAO – oksydaza wanililoalkoholowa z *Penicillium simplicissimum*; A – aceton, EtOH – etanol, EA – octan etylu

amin do intermediatu chinoidowego [23]. W podobny sposób otrzymano pochodne benzofuranu z katecholi i związków 1,3-dikarbonylowych poprzez ich kaskadową reakcję utleniania i addycji Michaela katalizowaną przez lakazę [29]. Inną reakcją opisywaną w mechanizmach transformacji lakazowych rodników jest reakcja Diels-Aldera, którą odnotowano w syntezie naftochinonów otrzymanych w wyniku przekształceń dienów z chinonami generowanymi przez lakazę [30]. Oprócz reakcji sprzęgania substratów w nowe struktury chemiczne, biotransformacja lakazowa może prowadzić do rozszczepienia związków organicznych [31] lub odłączenia podstawników (Ryc. 3). Przykładem tych ostatnich są reakcje odchlorowania [32] lub dekarboksylacji [33], przy czym produkty tych przekształceń również mogą być zaangażowane w reakcje syntezy nowych związków hybrydowych [34]. Należy tutaj podkreślić, że reakcje nieenzymatyczne, które obejmują sprzęganie rodników i spontaniczne reakcje rearanżacji wewnątrzcząsteczkowej i/lub cyklizacji, szczególnie w reakcjach heterocząsteczkowych są trudne do przewidzenia tak jak struktura otrzymanych produktów. Co ważne, reakcje lakazowe mogą być modyfikowane przez obecność rozpuszczalników organicznych, rozpuszczalników głęboko eutektycznych (DES), cieczy jonowych, które zwiększają rozpuszczalność substratów i tym samym podnoszą wydajność reakcji a obecność w mieszaninie reakcyjnej białek kierujących (DIR) dodatkowo wpływają na stereo- lub regiospecyficzność reakcji [4,5].

ZWIĄZKI BIOAKTYWNE OTRZYMYWANE W PROCESIE BOKATALIZY

Reakcje sprzęgania homo i heteromolekularnego rodników otrzymanych w wyniku utleniania fenoli i amin są szczególnie ważne w kontekście otrzymania nowych związków organicznych w tym o właściwościach bioaktywnych. Produkty reakcji charakteryzują się dużą różnorodnością struktur chemicznych, które nadają im charakterystycznych aktywności biologicznych (Tab. 1, Ryc. 5). Wśród nich można wyróżnić wiele produktów zawierających podstawniki hydroksylowe warunkujące właściwości antyoksydacyjne, czego przykładem są dimery i oligomery flawonoidów, biaryle, lignany, benzofurany, a także niektóre fenoksazyny i fenazyny (Ryc. 5). Inne produkty zawierają struktury charakterystyczne dla antybiotyków i tym samym wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową, jak np. otrzymane w reakcjach heterocząsteczkowych pochodne β -laktamów, aminoglikozydów i sulfonamidów oraz niektóre heterocykliczne fenazyny i tioetery (Rycina 5). Aktywność biologiczną wykazują również produkty o strukturze aminonaftochinonów i benzofuranów charakteryzujące się aktywnością przeciwnowotworową i przeciwzapalną, natomiast otrzymane benzimidazole i benzotiazole mogą wchodzić w skład leków lub być prekursorami do dalszych syntez innych związków bioaktywnych.

Ze względu na rodzaj utlenianych substratów produkty można podzielić na związki otrzymane w wyniku biotransformacji substratów naturalnych i syntetycznych (fenolo-

Tabela 2b. Przykłady produktów bioaktywnych otrzymanych w wyniku modyfikacji flawonoidów, alkaloidów i biopolimerów przez lakazę.

Substrat (-y)	Produkt (-y)		Źródło lakazy/ obecność rozpuszczalnika, mediatora i/lub białek	Piśmiennictwo
	rodzaj	aktywność biologiczna		
Flawonoidy				
luteolina	dimery	A, PB	<i>TpL</i>	[50]
izoramnetyna	dimery	A, PB	<i>TpL/ EtOH</i>	[51]
katechina	dimery	A	<i>TvL/ EtOH</i>	[52]
katechina	dimery i oligomery	A	<i>TvL</i>	[53]
rutyna	dimery i trimery	A, PZ	<i>PsL; Pcl</i>	[54]
daidzeina	dimer	A, PZ, PP	<i>TvL</i>	[55]
kampferol	utleniony kampferol	A, PZ, PP	<i>TvL</i>	[55]
sylibina	dimery	A, PN	<i>TvL</i>	[56]
Alkaloidy ergolinowe				
lizergol	C-4 pochodna hydroksylowa lizergolu	PM	<i>TvL/ TEMPO</i>	[57]
Biopolimery				
chitozan + kwercetyna/ kwas taninowy	modyfikowany chitozan	A, PB	<i>MtL</i>	[58]
chitozan + kwas ferulowy	modyfikowany chitozan	A, PB	<i>MtL</i>	[59,60]
chitozan + katechol, eugenol, kwas kawowy i alkohol sinapylowy	modyfikowany chitozan	A, PZ	<i>MtL</i>	[61]
chitozan + katechina + len	materiał multifunkcyjny	A, PB	<i>MtL</i>	[62]

EtOH – etanol

wych i niefenolowych) oraz produkty biotransformacji farmaceutyków.

POCHODNE SUBSTRATÓW NATURALNYCH I PROSTYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH

Naturalnymi substratami dla lakazy są głównie proste związki fenolowe, fenolokwasy i fenoloalkohole z wolnymi grupami hydroksylowymi i metoksyłowymi oraz flawonoidy, które ze względu na obecność grup hydroksylowych wykazują aktywność biologiczną i są chętnie utleniane przez lakazę (Tab. 2a i 2b). Są one przede wszystkim produktami metabolizmu wtórnego roślin i działają jako przeciwutleniacze lub substraty do innych syntez naturalnych związków bioaktywnych [5]. Pod wpływem lakazy pochodne fenoli są sprzęgane w związki wykazujące podobną aktywność biologiczną co substraty reakcji, czego przykładem są dimery flawonoidów o właściwościach antyoksydacyjnych [5]. Niektóre z substratów bioaktywnych

przekształcane są w produkty, które charakteryzują się odmiennymi właściwościami niż substraty reakcji. W ten sposób otrzymać można nowe związki przeciwnowotworowe oraz związki o aktywności przeciwbakteryjnej jak np. kwas cynabarynowy otrzymany w wyniku biotransformacji kwasu 3-hydroksyantranilowego o właściwościach antyoksydacyjnych (Tab. 3) [35].

Pochodne fenoli naturalnych

Naturalne związki fenolowe i ich pochodne są utleniane najczęściej do dimerów lub oligomerów, a w niektórych przypadkach ulegają cyklizacji i rearanżacji wewnątrzcząsteczkowej do struktur charakterystycznych dla benzofuranów, lignanów lub neolignanów głównie o aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej (Tab. 2a i 2b). Przykładem naturalnych fenoli utlenianych przez lakazę do nowych związków bioaktywnych są m.in. tyrozol, sezamol, syryngol, kwas kawowy oraz rezweratrol i jego pochodne. Pod

Tabela 3. Przykłady innych produktów bioaktywnych otrzymanych z naturalnych i syntetycznych substratów organicznych.

Substraty	Typ struktury chemicznej produktu	Aktywność biologiczna produktu	Źródło lakazy /rozpuszczalnik	Piśmiennictwo
Fenazyny i fenoksazyny				
kwasy 3-hydroksyantranilowy	fenoksazyna	PB	PcL	[35]
kwasy 3-amino-4-hydroksybenzenosulfonowy	fenoksazyna	A	CuL	[63,64]
orto- i para-diaminy aromatyczne	fenoksazyny i fenazyny	PB, A	BsL	[65,66]
kwasy 2-amino-3-metoksybenzoesowy i kwasy 2-aminonaftalenosulfonowy	fenazyna	PB, A	CuL	[25]
kwasy 2-amino-3-hydroksy-4-metylobenzoesowy	fenoksazyna	nb	TvL/ACN	[67]
kwasy 3-hydroxyortanilowy	fenoksazyna	nb	PcL	[68,69]
kwasy 2-amino-3-metoksybenzoesowy	fenazyna	A	CuL	[71]
Inne związki bioaktywne				
katechole i pochodne 1,3-dikarbonylowe	benzofurany	PN	MtL (Suberase®)	[72]
hydrochinon i benzoiloacetonitryl	pochodne chinonów	PN PB	TvL	[73]
kwasy 1,4-dihydroksy-2-naftowy i I-rzędowe aminy aromatyczne	aminonaftochinony	PN, CT	MtL (Novozyme 51003)/DMF	[74]
N-trans-feruolilo tyramina	neolignany (benzofurany)	PN	TvL/EA, DMSO	[75]
katechole i kumaryny	kumestany	PN	MtL (Suberase®)	[76]
p-chloroanilina	związki biarylowe	A, PG	TvL/EA, A	[77]
katechol i tiol	tioetery	PB, A	AbL	[27]
o-aminotiofenol + benzaldehyd	benzotiazole	Prekursory do syntezy związków bioaktywnych	MtL Suberase/ACN	[26]
o-fenylendiamina + benzaldehyd	benzimidazole		Novoprime Base 268/ACN	[26]

ACN – acetonitryl, EA – octan etylu, A – aceton, DMF – dimetyloformamid, DMSO – dimetylosulfotlenek; nb – nie badano

wpływem lakazy grzybowej tyrozol, sezamol i syryngol ulegają dimeryzacji lub oligomeryzacji przez nowe wiązania C-C do produktów o właściwościach antyoksydacyjnych [36-39]. W przypadku innych fenoli ulegają one dimeryzacji a następnie cyklizacji przez nowe wiązania C-O do struktur lignanów lub benzofuranów. Przykładowo kwas kawowy dimeryzował w pozycji 8-8' a następnie ulegał cyklizacji do produktu znanego jako felinsyna A (ang. phelinsin A) i wykazującego około 1,5 razy większe zdolności do zmiatania rodników niż substrat reakcji [40]. Inny rodzaj przekształceń ma miejsce w przypadku rezweratrolu i jego pochodnych, które pod wpływem lakazy i obecności octanu etylu ulegają dimeryzacji i cyklizacji do struktury benzofuranów o aktywności przeciwnowotworowej [41] i antyoksydacyjnej [42]. Inne substraty fenolowe zawierające podstawniki metoksyłowe, takie jak eugenol i alkohol koniferyłowy pod wpływem lakazy dimeryzują, a następnie cyklizują do pinorezinolu o strukturze lignanu, który jest postrzegany jako związek o działaniu przeciwgrzybiczym, antyoksydacyjnym, przeciwzapalnym i przeciwwirusowym (Ryc. 4B)

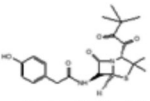
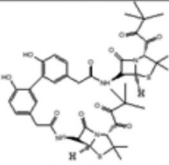
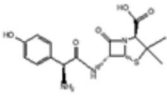
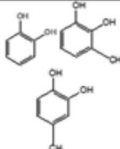
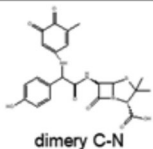
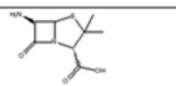
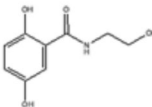
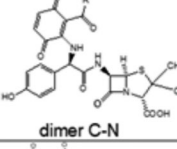
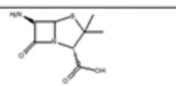
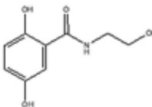
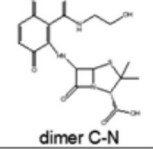
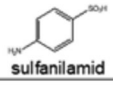
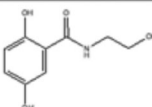
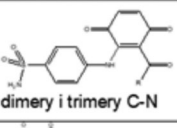
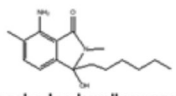
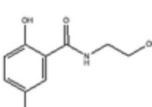
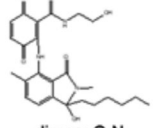
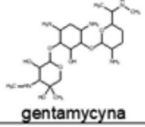
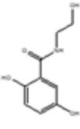
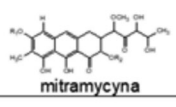

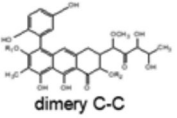
[43-45]. W wyniku utleniania alkoholu koniferyłowego i pochodnej 2-propenylosezamolu pod wpływem lakazy z *Trametes versicolor* i w obecności białek kierujących (DIR) można otrzymać inny lignan - karpanon, o aktywności przeciwwirusowej i przeciwgrzybiczej [45,46]. Produkty o strukturze benzofuranu są tworzone również w reakcji utleniania kwasu ferulowego i jego pochodnych oraz styrylofenolu [47-49]. Charakteryzowały się one głównie aktywnością antyoksydacyjną, a pochodna styrylofenolu otrzymana w obecności acetonu wykazywała właściwości modulujące aktywność białek szoku cieplnego Hsp90 [49].

Pochodne flawonoidów

Flawonoidy to kolejna grupa substratów, która pod wpływem lakazy może być utleniona do nowych związków bioaktywnych (Tab. 2b). Wiele z nich, z racji funkcji jakie pełnią w organizmach żywych, wykazuje właściwości bioaktywne, które nie zanikają w produktach ich enzymatycznego utlenienia przez lakazę a wręcz, tak jak

w przypadku właściwości antyoksydacyjnych, mogą być dodatkowo wzmocnione [50,51]. Może to wynikać z faktu, że w przypadku flawonoidów zarówno substraty jak i produkty sprzęgania posiadają liczne grupy hydroksylowe warunkujące tę aktywność. Otrzymane dimery lub oligomery są wynikiem tworzenia nowych wiązań typu C-C wytworzonych pomiędzy węglami pierścieni aromatycznych A i B dwóch cząsteczek flawonoidów lub powstają poprzez nowe wiązania C-O utworzone pomiędzy tlenem grupy hydroksylowej przyłączonej do pierścienia B a węglem pierścienia A innej cząsteczki flawonoidu [52]. Nieutlenione grupy hydroksylowe, które są obecne w strukturze produktów reakcji, np. w dimerach i oligomerach luteoliny, izoramnetyny, katechiny i rutyny, warunkują ich właściwości antyoksydacyjne [50-54]. Inne flawonoidy

takie jak np. kampferol i daidzeina pod wpływem lakazy są przekształcane do związków o właściwościach antyoksydacyjnych, przeciwzapalnych i przeciwpierwotniakowych [55]. Z kolei sylibina przy użyciu lakazy z *Trametes versicolor* jest utleniana do dimerów o aktywności przeciwnowotworowej i antyoksydacyjnej [56]. Oprócz opisanych wyżej przykładów związków naturalnych jako potencjalnych prekursorów nowych związków bioaktywnych, badania dowiodły, że lizergol będący przedstawicielem alkaloidów ergolinowych również może być przekształcony przez lakazę. W swojej strukturze posiada grupę hydroksylową, która może być podatna na atak lakazy, a produkt biotransformacji posiada potencjalną aktywność przeciwbólową [57].

Rodzaj produktu	Farmaceutyk (substrat A)	Partner reakcji (Substrat B)	Produkt	Źródło lakazy	Piśmiennictwo
	 estery penicyliny X	brak	 dimer C-C	TvL	[78]
β-laktamy	 amoksylicyna oraz inne penicyliny, cefalosporyny i karbacefemy cefadroksyl lorakarbef		 dimery C-N	TspL Mtl TvL	[79]
	 kwas 6-aminopenicylanowy kwas 7-aminocefalosporanowy		 dimer C-N	TspL Mtl TvL	[24,80,81]
	 kwas 6-aminopenicylanowy kwas 7-aminocefalosporanowy		 dimer C-N	TspL Mtl TvL	[82]
sulfonamidy	 sulfanilamid		 dimery i trimery C-N	TspL	[83]
N-analogi korollosporyny	 pochodne korollosporyny		 dimery C-N	TspL	[84]
aminoglikozydy	 gentamycyna		dimery C-N i C-O	Mtl	[85]
oligosacharydy	 mitramycyna		 dimery C-C	PaL	[86]

Rycina 6. Przykłady farmaceutyków modyfikowanych w reakcjach homo- lub heterocząsteczkowych przy udziale lakazy.

Innymi związkami naturalnymi, które mogą ulegać modyfikacji przy udziale lakazy do związków bioaktywnych są niektóre biopolimery, a w szczególności chitozan, nierozpuszczalny w wodzie polimer otrzymany w wyniku częściowej deacetylacji chityny (Tab. 2b). W jego przypadku nie jest on bezpośrednio utleniany przez enzym, ale może być modyfikowany przy użyciu innych związków aktywnych biologicznie, które są jednocześnie substratami lakazy. Przykładem takiej bioaktywnej pochodnej jest chitozan funkcjonalizowany przy użyciu kwasu ferulowego, kwercetyny lub kwasu taninowego, które zostały przyłączone poprzez jego grupy aminowe, podatne na addycję Michaela [58-61]. Produkt reakcji chitozanu z kwercytną w obecności lakazy z *Myceliophthora thermophila* wykazuje właściwości antyoksydacyjne nawet dwukrotnie większe niż chitozan niemodyfikowany [58]. Co ważne, reakcja zachodzi w temp. 30 °C w buforze o pH 6,5, bez konieczności dodatku rozpuszczalników organicznych i zapewnienia skrajnie kwasowego środowiska reakcji ułatwiającego rozpuszczenie i tworzenie hydrożeli chitozanu, co ma miejsce w syntezach chemicznych. Innym przykładem jest hydrożel chitozanu modyfikowany fenolami takimi jak kwas feulowy i jego pochodne, katechol, eugenol, kwas kawowy i alkohol sinapylowy, który wykazał 4-krotnie wyższą aktywność antyoksydacyjną i właściwości przeciwpalną [59-61]. Z kolei przyłączenie chitozanu i katechiny do powierzchni włókien lnianych utlenionych wcześniej przez lakazę skutkuje otrzymaniem multifunkcjonalnego materiału o aktywności antybakteryjnej i antyoksydacyjnej [62]. Takie modyfikacje biopolimerów niewątpliwie zwiększają potencjał ich zastosowań np. w sektorze medycznym [58-62].

Związki heterocykliczne zawierające azot

Fenoksazyony, fenoksazyny, fenazyny i fenotiazyny to naturalne, barwne związki heterocykliczne o aktywności biologicznej, które mogą być otrzymywane w reakcjach katalizowanych przez lakazę (Tab. 3). Naturalne fenoksazyny, takie jak cynabaryna, tramesanguina i kwas cynabarynowy, nadają charakterystyczne pomarańczowe zabarwienie owocnikom grzyba *Pycnoporus cinnabarinus*. Wspomniana wcześniej reakcja syntezy *in silico* kwasu cynabarynowego została przeprowadzona na wzór naturalnej reakcji zachodzącej u tego szczepu, dzięki czemu zespół Eggert udowodnił udział lakazy w dimeryzacji produkowanego przez *P. cinnabarinus* kwasu 3-hydroksyantranilowego (3-HAA) o działaniu antyoksydacyjnym do kwasu cynabarynowego o właściwościach przeciwbakteryjnych [35]. Utlenianiu 3-HAA towarzyszyła addycja Michaela z wytworzeniem wiązania typu C-N i cyklizacją z wytworzeniem wiązań typu C-O (Ryc. 4C) [35]. Reakcja ta stała się punktem wyjścia do syntezy innych związków heterocyklicznych zawierających szkielet fenoksazynowy, które można otrzymać w wyniku dimeryzacji pochodnych *orto*-aminofenoli pod wpływem lakazy, wśród których wiele związków wykazuje aktywność biologiczną (Tab. 3) [7,9,22]. O ile niektóre z substratów fenoksazyń posiadają właściwości bioaktywne tak jak produkty ich sprzęgania lakazowego, o tyle niektóre produkty bioaktywne można również otrzymać z substratów, które nie posiadają udokumentowanej aktywności bio-

logicznej (Tab. 3). Otrzymane związki heterocykliczne wykazywały m.in. właściwości antyoksydacyjne [63,64], ale w przypadku wszystkich otrzymanych fenoksazyń nie można wykluczyć potencjalnych innych właściwości bioaktywnych wynikających z obecności struktury heterocyklicznej z atomem azotu. Oprócz właściwości antyoksydacyjnych i antymikrobiologicznych nie można również wykluczyć innych potencjalnych zastosowań fenoksazyń i fenazyń np. w sektorze tekstylnym do wybarwienia tkanin, które wynikają z intensywnej barwy tych związków [65-69].

Kolejną grupą związków bioaktywnych, które mogą być syntetyzowane przy udziale lakazy jako biokatalizatora reakcji są fenazyny, heterocykliczne związki zawierające dwa atomy azotu. Naturalnie występujące fenazyny stanowią dużą grupę metabolitów wtórnych wybranych bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych (głównie z rodzin *Pseudomonas* i *Streptomyces*) na czele z picyjaniną produkowaną przez *Pseudomonas aeruginosa* [70]. Fenazyny wykazują działanie owadobójcze, przeciwbakteryjne, przeciw pasożytnicze i przeciwnowotworowe [70]. Badania wykazały, że związki o strukturze fenazyń mogą być otrzymywane w reakcji homocząsteczkowej *orto*- i *para*-diamin aromatycznych i ich pochodnych pod wpływem lakazy bakteryjnej z *Bacillus subtilis* [65,66]. Przykładem innych produktów bioaktywnych o strukturze fenazyń są związki otrzymane pod wpływem lakazy grzybowej z *Cerrena unicolor* w wyniku oligomeryzacji homocząsteczkowej kwasu 2-amino-3-metoksybenzoowego i oligomeryzacji heterocząsteczkowej tego substratu z kwasem 2-aminonafalenosulfonowym [71,25]. Oligomery kwasu 2-amino-3-metoksybenzoowego otrzymane w wyniku dimeryzacji i cyklokondensacji wykazały właściwości antyoksydacyjne a proponowana

Tabela 4. Wykaz gatunków grzybów i bakterii będących źródłem lakazy stosowanej do syntezy nowych związków bioaktywnych.

Nazwa szczepu	Akronim
<i>Agaricus bisporus</i>	AbL
<i>Bacillus subtilis</i>	BsL
<i>Botrytis cinerea</i>	BcL
<i>Cerrena unicolor</i>	CuL
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	CgL
<i>Myceliophthora thermofila</i>	MtL
<i>Polyporus anceps</i>	PaL
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	PcL
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	PsL
<i>Streptomyces coelicor</i>	ScL
<i>Trametes pubescens</i>	TpL
<i>Trametes villosa</i>	TvIL
<i>Trametes versicolor</i>	TvL
<i>Trametes sp.</i>	TspL

struktura zawierała szkielet fenazyiny [71]. Z kolei w reakcji heterocząsteczkowej tego substratu z pochodnymi kwasu aminonaftalenosulfonowego w pierwszym etapie reakcji następuje dimeryzacja dwóch cząsteczek kwasu 2-amino-3-metoksybenzoowego w produkt pośredni o strukturze iminy, który następnie kondensuje i cyklizuje z aminonaftalenem do struktury fenazyiny (Ryc. 4E) [25]. Produkt reakcji otrzymany w wyniku kondensacji z kwasem 2-amino-naftalenosulfonowym charakteryzował się unikatowymi właściwościami antybakteryjnymi wobec *S. aureus* i *S. epidermidis*, podczas gdy produkty cyklokondensacji produktu pośredniego z izomerami 4- i 5- kwasu aminonaftalenosulfonowego nie wykazywały tych właściwości [25].

Produkty o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, przeciwgrzybiczej i prekursorów leków

Oprócz związków o aktywności antyoksydacyjnej i antymikrobiologicznej w wyniku biotransformacji lakazowej można otrzymać również inne związki o aktywności przeciwnowotworowej (Tab. 3). Przykładem jest produkt otrzymany w wyniku utleniania katecholu i pochodnych dikarbonylowych przez lakazę grzybową z *Myceliophthora thermophila* do benzofuranów o właściwościach przeciwnowotworowych [72]. Również otrzymane produkty o strukturze chinonów i aminonaftochinonów, lignamidów oraz kumestanów wykazywały aktywność przeciwnowotworową [73-76]. Innym przykładem są związki biarylowe o aktywności antyoksydacyjnej i przeciwgrzybiczej otrzymane w reakcji homocząsteczkowej p-chloroaniliny [77]. Również inne związki heterocykliczne takie jak benzimidazole i benzotiazole mogą być otrzymane przy udziale lakazy. W ich przypadku nie udowodniono aktywności biologicznej, ale główny motyw tych cząsteczek wchodzi w skład np. leków gastrycznych, jak również mogą być one prekursorami wielu związków wykazujących m.in. aktywność antyoksydacyjną, przeciwwirusową i przeciwbakteryjną [26].

MODYFIKOWANE FARMACEUTYKI JAKO NOWE ZWIĄZKI PRZECIWDROBNOUSTROJOWE

Kolejną grupą substratów, które mogą być utleniane przy udziale lakazy do nowych związków bioaktywnych, są farmaceutyki stosowane w terapiach zwalczających zakażenia wywołane drobnoustrojami. Bieżącym wyzwaniem dla naukowców jest rosnąca oporność bakterii na stosowane terapeutyki, których chemiczne modyfikacje nie zawsze skutkują otrzymaniem skutecznych związków antybiotycznych. Problemem globalnym jest w szczególności oporność szczepów *Staphylococcus* i *Streptococcus* na β -laktamy, poprzez wytworzenie przez te bakterie szeregu strategii obronnych, w tym β -laktamaz, niweczących aktywność bójczą penicylin i ich pochodnych. Jednym ze sposobów na otrzymanie nowych farmaceutyków o ulepszonych właściwościach terapeutycznych i odporności na działanie enzymów bakteryjnych może być modyfikacja enzymatyczna antybiotyków za pomocą lakazy, a w szczególności sprzęganie ich z innymi związkami, w tym aktywnymi biologicznie lub ich składnikami (Ryc. 6) [9].

Najliczniejszą grupą antybiotyków badanych pod kątem zdolności do utleniania przez lakazę są związki o strukturze β -laktamu, a w szczególności penicyliny, cefalosporyny i

karbacefemy, które posiadają ugrupowanie benzyloaminy z wolną grupą aminową podatną na działanie lakazy i biorącą bezpośredni udział w tworzeniu nowych cząsteczek hybrydowych [23]. Przykładem związku przeciwbakteryjnego, którego synteza została opisana jako pierwsza, był dimer estru piwaliloksymetylowego penicyliny X [78]. Powstał on po utworzeniu nowych wiązań typu C-C pomiędzy podstawnikami fenylowymi i pomimo, że wykazywał nieco słabsze właściwości antybakteryjne wobec takich szczepów jak *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* niż substrat, stał się inspiracją dla innych badaczy poszukujących nowych pochodnych farmaceutyków otrzymanych za pomocą lakazy [78]. Substraty o znanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej ulegają sprzęganiu z innymi substratami lub partnerami reakcji w reakcjach heterocząsteczkowych a produkty tych przekształceń również wykazują właściwości przeciwbakteryjne (Ryc. 6) [9]. Dużą grupą nowo wytworzonych związków hybrydowych o strukturze β -laktamów stanowią produkty sprzęgania heterocząsteczkowego penicylin (amoksylicyna, ampicylina), cefalosporyn (cefadroksyl, cefalexin, cefaklor) lub karbacefemów (lorakarbef) zawierających wolną grupę aminową z dihydroksyarenami, z wydajnością reakcji sięgającą nawet 88% [23,24,79-82]. Otrzymane produkty są głównie dimerami i zawierają nowe wiązanie typu C-N wytworzone pomiędzy atomem azotu grupy aminowej farmaceutyku a atomem węgla ugrupowania aromatycznego partnera reakcji. Produkty charakteryzują się dobrymi właściwościami antybakteryjnymi wobec takich szczepów jak *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* i innych, porównywalnymi z właściwościami użytych do przekształceń farmaceutyków a w niektórych przypadkach wykazują nawet wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową niż zastosowane substraty reakcji. Ponadto, kilka z nowo utworzonych produktów hybrydowych charakteryzuje się dobrymi właściwościami bójczymi wobec szczepów wykazujących oporność wielolekową takich jak *S. aureus* i *En. faecalis*.

Inną grupą farmaceutyków zdolnych do utlenienia przez lakazę są sulfonamidy takie jak sulfamerazyna, sulfanilamid i 4,4'-sulfonylodianilina (dapson), które mogą być sprzęgane z pochodnymi kwasu 2,5-dihydroksybenzoowego jako partnerami reakcji z wydajnością reakcji sięgającą nawet 93% [83]. Otrzymane dimery lub trimery posiadają nowe wiązania typu C-N wytworzone tak jak w przypadku β -laktamów pomiędzy grupą aminową farmaceutyku a węglem układu aromatycznego drugiego substratu i wykazują dużo wyższe aktywności przeciwbakteryjne wobec *S. aureus* i *S. epidermidis* niż niemodyfikowane sulfonamidy [83]. Innymi substratami o aktywności przeciwbakteryjnej, które z powodzeniem mogą być zmodyfikowane przy udziale lakazy są związki zawierające komponent cukrowy, takie jak oligosacharyd mitramycyna, niektóre aminoglikozydy (gentamycyna, glukozamina, kanamycyna, tobramycyna) oraz korolosporyna [84,85]. Wymienione farmaceutyki mogą być sprzęgane z pochodnymi kwasu 2,5-dihydroksybenzoowego jako partnerami reakcji a otrzymane dimery z nowymi wiązaniami typu C-N również wykazują aktywność przeciwbakteryjną (Ryc. 6) [85-86]. Azole i morfoliny to kolejne przykłady farmaceutyków o aktywności przeciwgrzybiczej, które mogą być substratem dla lakaz. Przykładowo azole takie jak 1-aminobenzotriazol mogą być sprzęgane

z hydrochinonem lub z pochodnymi kwasu 2,5-dihydroksybenzoesowego do form dimerów i/lub oligomerów z nowo wytworzonymi wiązaniami typu C-N i w wykazują zarówno właściwości przeciwgrzybicze jak i przeciwbakteryjne [87,88].

POTENCJAŁ ZASTOSOWANIA LAKAZY W PRZEMYSŁE

Zastosowanie lakazy jako „zielonego biokatalizatora reakcji” niesie ze sobą duży potencjał aplikacyjny. Literatura naukowa podaje wiele przykładów potencjalnych zastosowań tej uniwersalnej oksydoreduktazy w różnych gałęziach przemysłu. Oprócz katalizowania reakcji syntezy związków bioaktywnych, lakaza może być stosowana m.in. do wybielania pulpy drzewnej na potrzeby przemysłu papierniczego [89], do syntezy nowych związków barwnych lub jako wybielacz tkanin na potrzeby przemysłu tekstylnego [90], w syntezie nowych farb koloryzujących włosy oraz jako składnik kosmetyków do wybielania przebarwień skórnych [90,91] a nawet do stabilizacji soków owocowych i win oraz modyfikacji korków winiarskich [92]. Szczególnie lakazy grzybowe, łatwo pozyskiwane z hodowli fermentacyjnych, mogą odgrywać tutaj dużą rolę, tak jak ma to miejsce w przypadku syntezy związków bioaktywnych (Tab. 4). Oprócz wielu zalet użycia lakaz w procesach przemysłowych, posiadają one również pewne cechy, które ograniczają ich możliwości katalityczne i aplikacyjne. Zastosowanie ich na skalę przemysłową wymaga bowiem uwzględnienia kilku czynników, które przede wszystkim ograniczyłyby koszty związane z pozyskiwaniem enzymu i jego wielokrotnym zastosowaniem. W tym przypadku pomocne wydaje się być zaangażowanie ekspresji heterologicznej i opracowanie technik immobilizacji w celu uzyskania enzymu o wysokiej aktywności, termostabilności i odporności na obecność rozpuszczalników organicznych lub inhibitorów, które są często spotykane w przemyśle [93]. Innymi ograniczeniami stosowania lakazy w syntezie organicznej są rodniki powstające w wyniku działania lakazy na substrat. Ich obecność jest warunkiem koniecznym dla reakcji sprzęgania w nowe struktury chemiczne, ale warto podkreślić, że istnieje możliwość powstania wielu różnych form rezonansowych rodników utlenionej cząsteczki. Skutkiem tego jest ich nieenzymatyczne sprzęganie do wielu różnych produktów reakcji występujących dodatkowo w mieszaninie ich form racemicznych. Obecność wysokich stężeń rozpuszczalników organicznych minimalizuje te procesy i ogranicza zjawisko polimeryzacji, a tym samym zwiększa wydajność reakcji o ile nie następuje inaktywacja enzymów przez rozpuszczalniki. Dlatego też kluczowymi obszarami badawczymi, które wymagają szczególnej uwagi są poszukiwanie tanich źródeł lakazy i substratów oraz opracowanie wydajnych reakcji syntezy enancjomerycznie czystych związków bioaktywnych.

PODSUMOWANIE

Lakaza jest uniwersalnym biokatalizatorem stosowanym do syntezy związków aktywnych biologicznie o zróżnicowanej strukturze chemicznej. Wśród struktur chemicznych nowych związków aktywnych biologicznie można wyróżnić dimery i oligomery homo- lub heterocząsteczkowe, w tym związki o strukturze np. benzofuranów, lignanów, fe-

nazyn, fenoksazyn, biaryli i aminonaftochinonów oraz pochodne antybiotyków. Reakcje katalizowane przez lakazę nie wymagają użycia szkodliwych, często toksycznych substancji utleniających i sprzęgających oraz skrajnych wartości pH i temperatury, a ko-substratem reakcji jest powszechnie dostępny tlen cząsteczkowy. Dodatek niewielkiej ilości rozpuszczalników pozytywnie wpływa na rozpuszczalność substratów i stereospecyficzność reakcji sprzęgania. W wyniku reakcji sprzęgania rodników otrzymanych podczas utleniania różnych substratów fenolowych i niefenolowych oraz farmaceutyków można otrzymać nowe związki bioaktywne m.in. o działaniu antyoksydacyjnym, przeciwdrobnoustrojowym, przeciwzapalnym a nawet związki o aktywności przeciwnowotworowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Torres-Ortiz D, García-Alcocer G, Berumen-Segura LC, Estévez M (2024) Green extraction of secondary metabolites from plants: Obstacles, current status, and trends. *Sustain Chem Environ* 8:100157
2. Conrado R, Gomes TC, Roque GSC, De Souza AO (2022) Overview of bioactive fungal secondary metabolites: cytotoxic and antimicrobial compounds. *Antibiotics (Basel)* 11(11):1604
3. Tatsuta K (2008) Total synthesis and development of bioactive natural products. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84(4):87-106
4. Bassanini I, Ferrandi EE, Riva S, Monti D (2021) Biocatalysis with laccases: an updated overview. *Catalysts* 11:26
5. Cardullo N, Muccilli V, Tringali C (2022) Laccase-mediated synthesis of bioactive natural products and their analogues. *RSC Chem Biol* 3:614
6. Mikolasch A, Schauer F (2009) Fungal laccase as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:605-624
7. Sousa AC, Martins LO, Robalo MP (2021) Laccases: Versatile biocatalysts for the synthesis of heterocyclic cores. *Molecules* 26(12)
8. Kudanga T, Nemaadza B, Le Roes-Hill M (2017) Laccase catalysis for the synthesis of bioactive compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(1):13-33
9. Hahn V (2023) Potential of the enzyme laccase for the synthesis and derivatization of antimicrobial compounds. *World J Microbiol Biotechnol* 39:107
10. Arregui L, Ayala M, Gómez-Gil X *et al.* (2019) Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb Cell Fact* 18:200
11. Bai Y, Ali S, Liu S, Zhou J, Tang Y (2023) Characterization of plant laccase genes and their functions. *Gene* 852:147060
12. Brugnari T, Braga DM, dos Santos CSA *et al.* (2021) Laccases as green and versatile biocatalysts: from lab to enzyme market—an overview. *Bioresour Bioprocess* 8:131
13. Chauhan PS, Goradia B, Saxena A (2017) Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech* 7(5):323
14. Kramer KJ, Kanost MR, Hopkins TL, Jing H, Zhu YC, Xu R, Kerwin JL, Turecek F (2001) Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron* 57:385-392
15. Yoshida, H (1883) Chemistry of Lacquer (Urushi) Part 1. *J Chem Soc* 43:472-486
16. Luterek J, Gianfreda L, Wojtaś-Wasilewska M, Rogalski JM, Jaszek MB, Malarczyk E, Dawidowicz AL, Finks-Boots M, Ginalska G, Leonowicz A (1997) Screening of the wood-rotting fungi for laccase production: Induction by ferulic acid, partial purification, and immobilization of laccase from the high laccase-producing strain, *Cerrera unicolor*. *Acta Microbiol Pol* 46:297-311
17. Johnson DL, Thompson JL, Brinkmann SM, Schuller KA, Martin LL (2003) Electrochemical characterization of purified *Rhus vernicifera*

- laccase: voltammetric evidence for a sequential four-electron transfer. *Biochemistry* 2;42(34):10229-37
18. Piontek K, Antorini M, Choinowski T (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem* 277(40):37663-9
 19. Xu F (1997) Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J Biol Chem* 272:924-928
 20. Fernandez-Sanchez C, Tzanov T, Gubitz GM, Cavaco-Paulo A (2002) Voltametric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions. *Bioelectrochemistry* 58:149-156
 21. Diaz-Rodriguez A, Martinez-Montero L, Lavandera I, Gotor V, Gotor-Fernandez V (2014) Laccase/2,2,6,6-tetramethylpiperidinoxyl radical (TEMPO): an efficient catalytic system for selective oxidations of primary hydroxy and amino groups in aqueous and biphasic media. *Adv Synth Catal* 356:2321-2329
 22. Hahn V, Mikolasch A, Weitemeyer J, Petters S, Davids T, Lalk M, Lackmann JW, Schauer F (2020) Ring-closure mechanisms mediated by laccase to synthesize phenothiazines, phenoxazines, and phenazines. *ACS Omega* 5:14324-14339
 23. Mikolasch A, Manda K, Schluter R, Lalk M, Witt S, Seefeldt S, Hammer E, Schauer F, Julich WD, Lindequist U (2012) Comparative analyses of laccase-catalyzed amination reactions for production of novel beta-lactam antibiotics. *Biotechnol Appl Biochem* 59:295-306
 24. Mikolasch A, Niedermeyer THJ, Lalk M, Witt S, Seefeldt S, Hammer E, Schauer F, Gesell M, Hessel S, Jülich WD, Lindequist U (2006) Novel penicillins synthesized by biotransformation using laccase from *Trametes spec.* *Chem Pharm Bull* 54:632-638
 25. Polak J, Wlizio K, Pogni R, Petricci E, Graż M, Szalopata K, Osńska-Jaroszk M, Kapral-Piotrowska J, Pawlikowska-Pawłęga B, Jarosz-Wilkolazka A (2020) Structure and bioactive properties of novel textile dyes synthesised by fungal laccase. *Int J Mol Sci* 21:2052
 26. Maphupha M, Juma WP, de Koning CB, Brady DA (2018) Modern and practical laccase-catalysed route suitable for the synthesis of 2-arylbenzimidazoles and 2-arylbenzothiazoles. *RSC Adv* 8:39496-39510
 27. Abdel-Mohsen HT, Conrad J, Beifuss U (2014) Laccase-catalyzed synthesis of catechol thioethers by reaction of catechols with thiols using air as an oxidant. *Green Chem* 16(1):90-95
 28. Niedermeyer TH, Mikolasch A, Lalk M (2005) Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: reaction products of p-hydroquinones and primary aromatic amines. *J Org Chem* 70(6):2002
 29. Hajdok S, Leutbecher H, Greiner G, Conrad J, Beifuss U (2007) Laccase initiated oxidative domino reactions for the efficient synthesis of 3,4-dihydro-7,8-dihydroxy-2Hdibenzofuran-1-ones. *Tetrahedron Lett* 48:5073-5076
 30. Witayakran S, Zettli A, Ragauskas A J (2007) Laccase-generated quinones in naphthoquinone synthesis via Diels-Alder reaction. *Tetrahedron Lett* 48(17):2983-2987
 31. Kawai S, Umezawa T, Shimada M, Higuchi T (1988) Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. *FEBS Lett* 236(2):309-311
 32. Leontievsky AA, Myasoedova NM, Baskunov BP, Golovleva LA, Bucke C, Evans CS (2001) Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. *Appl Microbiol Biotechnol* 57(1-2):85-91
 33. Agematu H, Shibamoto N, Nishida H, Okamoto R, Shin T, Murao S (1993) Oxidative decarboxylations of 4-hydroxymandelic acid and 2-(4-hydroxyphenyl)glycine by laccase from *Coriolus versicolor* and bilirubin oxidases from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*. *Biosci Biotechnol Biochem* 57(11):1877-1881
 34. Hahn V, Mikolasch A, Schauer F (2014) Cleavage and synthesis function of high and low redox potential laccases towards 4-morpholinylaniline and aminated as well as chlorinated phenols. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(4):1609-1620
 35. Eggert C, Temp U, Dean JF, Eriksson KE (1995) Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEBS Lett* 376:202-206.
 36. Burton SG, Davids LM (2012) Hydroxytyrosol compounds. Patent: ZA201202288B
 37. Constantin MA, Conrad J, Beifuss U (2012) An unprecedented oxidative trimerization of sesamol catalyzed by laccases. *Tetrahedron Lett* 53:3254-3258
 38. Adelakun OE, Kudanga T, Green IR, le Roes-Hill M, Burton SG (2012) Enzymatic modification of 2,6-dimethoxyphenol for the synthesis of dimers with high antioxidant capacity. *Process Biochem* 47:1926-1932
 39. Schirmann JG, Dekker RFH, Borsato D, Barbosa-Dekker AM (2018) Selective control for the laccase-catalyzed synthesis of dimers from 2,6-dimethoxyphenol: Optimization of 3,3',5,5'-tetramethoxy-biphenyl-4,4'-diol synthesis using factorial design, and evaluation of its antioxidant action in biodiesel. *Appl Catal A* 555:88-97
 40. Nemadziva B, Le Roes-Hill M, Koorbanally N, Kudanga T (2018) Small laccase-catalyzed synthesis of a caffeic acid dimer with high antioxidant capacity. *Process Biochem* 69:99-105
 41. Bhusainahalli VM, Spatafora C, Chalal M, Vervandier-Fasseur D, Meunier P, Latruffe N, Tringali C (2012) Resveratrol-related dehydrodimers: laccase-mediated bio-mimetic synthesis and antiproliferative activity. *Eur J Org Chem* 5217-5224
 42. Beneventi E, Conte S, Cramarossa MR, Riva S, Forti L (2015) Chemo-enzymatic synthesis of new resveratrol-related dimers containing the benzo[b]furan framework and evaluation of their radical scavenger activities. *Tetrahedron* 71:3052-3058
 43. Ricklefs E, Girhard M, Urlacher VB (2016) Three-steps in one-pot: whole-cell biocatalytic synthesis of enantiopure (+)- and (-)-pinoresinol via kinetic resolution. *Microb Cell Fact* 15:1-11
 44. Ricklefs E, Girhard M, Koschorreck K, Smit MS, Urlacher VB (2015) Two-step one-pot synthesis of pinoresinol from eugenol in an enzymatic cascade. *ChemCatChem* 7:1857-1864
 45. Kim SS, Sattely ES (2021) Dirigent proteins guide asymmetric heterocoupling for the synthesis of complex natural product analogues. *J Am Chem Soc* 143:5011-5021
 46. Constantin MA, Conrad J, Merisor E, Koschorreck K, Urlacher VB, Beifuss U (2012) Oxidative dimerization of (E)- and (Z)-2-propenylsesamol with O₂ in the presence and absence of laccases and other catalysts: selective formation of carpanones and benzopyrans under different reaction conditions. *J Org Chem* 77:4528-4543
 47. Adelakun OE, Kudanga T, Parker A, Green IR, le Roes-Hill M, Burton SG (2012) Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *J Mol Catal B: Enzym* 74:29-35
 48. Constantin MA, Conrad J, Beifuss U (2012) Laccase-catalyzed oxidative phenolic coupling of vanillidene derivatives. *Green Chem* 14:2375-2379
 49. Bassanini I, D'Annessa I, Costa M, Monti D, Colombo G, Riva S (2018) Chemo-enzymatic synthesis of (E)-2,3-diaryl-5-styryl-trans-2,3-dihydrobenzofuran-based scaffolds and their *in vitro* and *in silico* evaluation as a novel subfamily of potential allosteric modulators of the 90 kDa heat shock protein (Hsp90). *Org Biomol Chem* 16:3741-3753
 50. Aruwa CE, Amoo SO, Koorbanally N, Kudanga T (2021) Enzymatic dimerization of luteolin enhances antioxidant and antimicrobial activities. *Biocatal Agric Biotechnol* 35:102105
 51. Aruwa CE, Amoo SO, Koorbanally N, Kudanga T (2022) Laccase-mediated modification of isorhamnetin improves antioxidant and antibacterial activities. *Process Biochem* 112:53-61
 52. Deshaies S, le Guernevé C, Suc L, Mouls L, Garcia F, Saucier C (2021) Unambiguous NMR structural determination of (+)-catechin-laccase dimeric reaction products as potential markers of grape and wine oxidation. *Molecules* 26(20):6165
 53. Jadhav SB, Singhal RS (2014) Laccase-gum Arabic conjugate for preparation of water-soluble oligomer of catechin with enhanced antioxidant activity. *Food Chem* 150:9-16
 54. Uzan E, Portet B, Lubrano C, Milesi S, Favel A, Lesage-Meessen L, Lomascolo A (2011) *Pycnoporus* laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:97-105

55. Yan QS, Tang XG, Zhang BJ, Wang CJ, Deng S, Ma XC, Wang C, Li DW, Huang SS, Dong PP (2019) Biocatalytic oxidation of flavone analogues mediated by general biocatalysts: horseradish peroxidase and laccase. *RSC Adv* 9:13325–13331
56. Vavříková E, Vacek J, Valentová K, Marhol P, Ulrichová J, Kuzma M, Křen V (2014) Chemo-enzymatic synthesis of silybin and 2,3-dehydro-silybin dimers. *Molecules* 19(4):4115–4134
57. Chirivì C, Fontana G, Monti D, Ottolina G, Riva S, Danieli B (2012) The quest for new mild and selective modifications of natural structures: laccase-catalysed oxidation of ergot alkaloids leads to unexpected stereoselective C-4 hydroxylation. *Chem Eur J* 18:10355–10361
58. Bozic M, Gorgjeva S, Kokol V (2012) Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin. *Carbohydr Polym* 89:854–864
59. Aljawish A, Chevalot I, Piffaut B, Rondeau-Mouro C, Girardin M, Jasniowski J, Scher J, Muniglia L (2012) Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydr Polym* 87:537–544
60. Aljawish A, Chevalot I, Jasniowski J, Revol-Junelles AM, Scher J, Muniglia L (2014) Laccase-catalysed functionalisation of chitosan by ferulic acid and ethyl ferulate: evaluation of physicochemical and biofunctional properties. *Food Chem* 161:279–287
61. Huber D, Grzelak A, Baumann M, Borth N, Schleining G, Nyanhongo GS, Guebitz GM (2018) Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of laccase synthesized phenolic-O-carboxymethyl chitosan hydrogels. *New Biotechnol* 40:236–244
62. Silva C, Matama T, Kim S, Padrao J, Prasetyo EN, Kudanga T, Nyanhongo GS, Guebitz GM, Casal M, Cavaco-Paulo A (2011) Antimicrobial and antioxidant linen via laccase-assisted grafting. *React Funct Polym* 71(7):713–720
63. Forte S, Polak J, Valensin D, Taddei M, Basosi R, Vanhulle S, Jarosz-Wilkolazka A, Pogni R (2010) Synthesis and structural characterization of a novel phenoxazinone dye by use of a fungal laccase. *J Mol Catal B* 63(3–4):116–120
64. Polak J, Jarosz-Wilkolazka A, Szalapatka K, Graz M, Osinska-Jarozuk M (2016) Laccase-mediated synthesis of a phenoxazine compound with antioxidative and dyeing properties - the optimisation process. *New Biotechnol* 33(2):255–262
65. Sousa AC, Oliveira MC, Martins LO, Robalo MP (2014) Towards the rational biosynthesis of substituted phenazines and phenoxazinones by laccases. *Green Chem* 16(9):4127–4136
66. Sousa AC, Oliveira MC, Martins LO, Robalo MP (2018) A sustainable synthesis of asymmetric phenazines and phenoxazinones mediated by CotA-laccase. *Adv Synth Catal* 360(3):575–583
67. Osiadacz J, Al-Adhami AJH, Bojarszewska D, Fischer P, Peczyńska-Czoch W (1999) On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. *J Biotechnol* 72:141–149
68. Bruyneel F, Enaud E, Billottet L, Vanhulle S, Marchand-Brynaert J (2008) Regioselective synthesis of 3-hydroxyorthanilic acid and its biotransformation into a novel phenoxazinone dye by use of laccase. *Eur J Org Chem* 1:70–79.25
69. Bruyneel F, Dive G, Marchand-Brynaert J (2012) Non-symmetrically substituted phenoxazinones from laccase-mediated oxidative cross-coupling of aminophenols: an experimental and theoretical insight. *Org Biomol Chem* 10:1834–1846
70. Serafim B, Bernardino AR, Freitas F, Torres CAV (2023) Recent developments in the biological activities, bioproduction, and applications of *Pseudomonas* spp. phenazines. *Molecules* 28(3):1368
71. Wlizio K, Polak J, Jarosz-Wilkolazka A, Pogni R, Petricci E (2020) Novel textile dye obtained through transformation of 2-amino-3-methoxybenzoic acid by free and immobilised laccase from a *Pleurotus ostreatus* strain. *Enzym Microb Technol* 132:109398
72. Wellington KW, Qwebani-Ogunleye T, Kolesnikova NI, Brady D, de Koning CB (2013) One-pot laccase-catalysed synthesis of 5,6-dihydroxylated benzo[b]furans and catechol derivatives, and their anticancer activity. *Arch Pharm* 346:266–277
73. Cannatelli MD, Ragauskas AJ (2015) Laccase-catalyzed alpha-arylation of benzoylacetone with substituted hydroquinones. *Chem Eng Res Des* 97:128–134
74. Wellington KW, Kolesnikova NI (2012) A laccase-catalysed one-pot synthesis of aminonaphthoquinones and their anticancer activity. *Bioorg Med Chem* 20:4472–4481
75. Cardullo N, Pulvirenti L, Spatafora C, Musso N, Barresi V, Condorelli DF, Tringali C (2016) Dihydrobenzofuran neolignan amides: laccase-mediated biomimetic synthesis and antiproliferative activity. *J Nat Prod* 79:2122–2134
76. Qwebani-Ogunleye T, Kolesnikova NI, Steenkamp P, de Koning CB, Brady D, Wellington KW (2017) A one-pot laccase-catalysed synthesis of coumestan derivatives and their anticancer activity. *Bioorg Med Chem* 25:1172–1182
77. Campos AM, Mendoza L, Vasquez J, Melo R, Salas J, Cotoras M (2016) Laccase catalyzed-synthesis of 4,4'-biphenyldiamine from p-chloroaniline. Evaluation of antifungal and antioxidant activities. *J Chil Chem Soc* 61:3031–3033
78. Agematu H, Tsuchida T, Kominato K, Shibamoto N, Yoshioka T, Nishida H, Okamoto R, Shin T, Murao S (1993) Enzymatic dimerization of penicillin-X. *J Antibiot* 46:141–148
79. Mikolasch A, Wurster M, Lalk M, Witt S, Seefeldt S, Hammer E, Schauer F, Jülich WD, Lindequist U (2008) Novel beta-lactam antibiotics synthesized by amination of catechols using fungal laccase. *Chem Pharm Bull* 56:902–907
80. Mikolasch A, Niedermeyer THJ, Lalk M, Witt S, Seefeldt S, Hammer E, Schauer F, Gesell Salazar M, Hessel S, Jülich WD, Lindequist U. (2007) Novel cephalosporins synthesized by amination of 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives using fungal laccases II. *Chem Pharm Bull* 55:412–416
81. Mikolasch A, Hildebrandt O, Schlüter R, Hammer E, Witt S, Lindequist U (2016) Targeted synthesis of novel beta-lactam antibiotics by laccase-catalyzed reaction of aromatic substrates selected by pre-testing for their antimicrobial and cytotoxic activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(11):4885–4899
82. Mikolasch A, Hammer E, Witt S, Lindequist U (2020) Laccase-catalyzed derivatization of 6-aminopenicillanic, 7-aminocephalosporanic and 7-aminodesacetoxycephalosporanic acid. *AMB Express* <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01117-0>.
83. Mikolasch A, Hahn V (2021) Laccase-catalyzed derivatization of antibiotics with sulfonamide or sulfone structures. *Microorganisms* 9(11):2199
84. Mikolasch A, Hessel S, Gesell Salazar M, Neumann H, Manda K, Gördes D, Schmidt E, Thurow K, Hammer E, Lindequist U, Beller M, Schauer F (2008) Synthesis of new N-analogous corollosporine derivatives with antibacterial activity by laccase catalyzed amination. *Chem Pharm Bull* 56:781–786
85. Mikolasch A, Lindequist U, Witt S, Hahn V (2022) Laccase-catalyzed derivatization of aminoglycoside antibiotics and glucosamine. *Microorganisms* 10(3):626
86. Anyanwutaku IO, Petroski RJ, Rosazza JP (1994) Oxidative coupling of mithramycin and hydroquinone catalyzed by copper oxidases and benzoquinone. Implications for the mechanism of action of aureolic acid antibiotics. *Bioorg Med Chem* 2(6):543–551
87. Hahn V, Mikolasch A, Wende K, Bartrow H, Lindequist U, Schauer F (2010) Derivatization of the azole 1-aminobenzotriazole using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila*: influence of methanol on the reaction and biological evaluation of the derivatives. *Biotechnol Appl Biochem* 56:43–48
88. Hahn V, Mikolasch A, Wende K, Bartrow H, Lindequist U, Schauer F (2009) Synthesis of model morpholine derivatives with biological activities by laccase-catalysed reactions. *Biotechnol Appl Biochem* 54:187–195
89. Singh G, Arya SK (2019) Utility of laccase in pulp and paper industry: A progressive step towards the green technology. *Int J Biol Macromol* 134:1070–1084
90. Polak J, Jarosz-Wilkolazka A (2012) Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochem* 47:1295–307

91. Gigli V, Piccinino D, Avitabile D, Antiochia R, Capecchi E, Saladino R (2022) Laccase mediator cocktail system as a sustainable skin whitening agent for deep eumelanin decolorization. *Int J Mol Sci*23(11):6238
92. Backes E, Kato CG, Corrêa RCG, Peralta Muniz Moreira R de F, Peralta RA, Barros L, Ferreira ICFR, Zanin GM, Bracht A, Peralta RM (2021) Laccases in food processing: Current status, bottlenecks and perspectives. *Trends Food Sci Technol* 115:445-460
93. Mate DM, Alcalde M (2015) Laccase engineering: from rational design to directed evolution. *Biotechnol Adv* 33:25-40

Laccase as a useful biotechnological tool in the synthesis of biologically active compounds

Jolanta Polak✉

Institute of Biological Sciences, Department of Biochemistry and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin

✉corresponding author: jolanta.polak@mail.umcs.pl

Key words: laccase, biocatalysis, bioactive compounds, biotransformation, coupling reaction

ABSTRACT

The synthesis of organic compounds using oxidoreductive enzymes as biocatalysts is increasingly being considered as an environmentally friendly alternative to classical chemical synthesis. An example of such an enzyme, which exhibits low substrate specificity and operates under mild conditions of pH, pressure and temperature, is laccase, a versatile phenolic oxidase that uses oxygen as a natural reaction co-substrate. It can oxidise both phenolic derivatives and aromatic amines, which in homo- or heteromolecular reactions are coupled to form new organic compounds with unique properties and applications, also as biologically active molecules. Among the many bioactive substances obtained by biocatalysis, substances with antioxidant, anticancer, anti-inflammatory and antimicrobial activities can be distinguished. Especially the latter are of great value in the context of the search for new therapeutic compounds that can overcome the phenomenon of bacterial drug resistance.

