



UNIUNEA
EUROPEANĂ



GUVERNUL
ROMÂNIEI
MINISTERUL
MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI
SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social
European
POSDRU 2007-2013



Instrumente
Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
BABEȘ-BOLYAI
CLUJ-NAPOCA



UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”
CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



Lacaza din *Sclerotinia sclerotiorum*: caracterizare biochimică și aplicații

- teză de doctorat -

Doctorand: **Augustin-Cătălin Moț**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Florin Dan Irimie**

CLUJ-NAPOCA - 2012



UNIUNEA
EUROPEANĂ



GUVERNUL
ROMÂNIEI
MINISTERUL
MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI
SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social
European
POSDRU 2007-2013



Instrumente
Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
BABEȘ-BOLYAI
CLUJ-NAPOCA

Investește în oameni !

FONDUL SOCIAL EUROPEAN

Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane
2007 – 2013

Axa prioritară 1. Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii
economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere

Domeniul major de intervenție 1.5. Programe doctorale și
postdoctorale în sprijinul cercetării

Contract nr: POSDRU/88/1.5/S/60185: „STUDII DOCTORALE
INOVATIVE ÎNTR-O SOCIETATE BAZATĂ PE CUNOAȘTERE”

Cuprinsul tezei

Cuprins	v
Lista Figurilor	viii
Lista Tabelelor	xv
Abreviații	xvi
Mulțumiri	xviii
Obiectivele tezei	xix
Introducere generală	xxi
Capitolul 1. Studiul de literatură	1
1.1. Introducere	1
1.2. Structura generală a lacazelor	2
1.2.1. Caracteristicile arhitecturale ale lacazelor	2
1.2.2. Capătul C-terminal al asco-lacazelor	5
1.2.3. Lacaze cu structură cuaternară	7
1.2.4. Glicozilarea lacazelor	8
1.3. Structura situsurilor active ale lacazelor	9
1.3.1. Situsul activ cu ion de cupru de tip T1	9
1.3.1.1. Caracteristicile spectrale ale centrului de tip T1	10
1.3.1.2. Structura centrului de tip T1	11
1.3.1.3. Potențialul redox al cuprului de tip T1	12
1.3.1.4. Structura buzunarului catalitic din centrul T1	16
1.3.2. Situsul catalitic trinuclear	17
1.4. Mecanismul catalitic al lacazelor	19
1.4.1. Reducerea oxigenului molecular la apă	19
1.4.2. Oxidarea substratelor organice	23
1.5. Purificarea, caracterizarea și aplicațiile lacazelor	24
1.5.1. Sursele naturale și rolul fiziologic ale lacazelor	24
1.5.2. Purificarea lacazelor	28
1.5.3. Caracterizarea biochimică a lacazelor	29
1.5.4. Aplicațiile lacazelor	30
1.6. Sclerotinia sclerotiorum ca potențial candidat pentru sursă de lacază	36
1.7. Compleții cu cupru ca și modele pentru situsurile active ale lacazelor	37
1.6.1. Compuși model pentru centrul metalic de tip T1	39
1.6.2. Compuși model pentru centrele metalce de tip T2/3	41
Chapter 2. Lacaza din <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> este indusă prin căi metabolice de stres	43
2.1. Introducere	43
2.2. Materiale și metode	44
2.2.1. Reactivi și chimicale	44
2.2.2. Mediul de cultură și condițiile de cultivare	44
2.2.3. Screening-ul de inductori pentru lacază	45
2.2.4. Surse de carbon și azot	45
2.2.5. Extractul de drojdie ca și inductor pentru lacază	46
2.2.6. Extractul de <i>Chelidonium majus</i> pentru inducerea lacazei	47
2.2.7. pH-ul și rolul lui în inducerea lacazei	47

2.2.8. Măsurători de biomasă	47
2.2.9. Măsurarea activității lacazice	47
2.2.10. Analiza statistică a datelor	48
2.3. Rezultate și discuții	48
2.3.1. Screening-ul pentru inducerea lacazelor	48
2.3.2. Surse de caron și azot ca și regulatori ai activității lacazice	48
2.3.3. Extractul de drojdie accentuează producerea de lacază	52
2.3.4. Influența extractului de <i>Chelidonium majus</i> asupra producerii lacazei	56
2.3.5. pH-ul ca și regulator al activității lacazei în <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	58
2.4. Concluzii.....	60
Chapter 3. Izolarea, purificarea și caracterizarea lacazei din <i>S. sclerotiorum</i>	61
3.1. Introducere.....	61
3.2. Materiale și metode.....	62
3.2.1. Mediul de cultură și condiții de creștere	62
3.2.2. Izolarea enzimei	62
3.2.3. Analiza enzimatică și determinarea conținutului proteic	63
3.2.4. Caracterizarea enzimei	63
3.2.4.1 Electroforeză	63
3.2.4.2. Determinarea masei moleculare	64
3.2.4.3. Analize spectrale	64
3.2.5. Analiza statistică	64
3.2.6. Caracterizarea lacazei prin spectrometrie de masă	65
3.3. Resultate și discuții	66
3.3.1. Cultura ciupercii și purificarea enzimei	66
3.3.2. Caracterizarea enzimei purificată.....	68
3.4. Concluzii.....	77
Chapter 4. Aspecte mecanistice privind lacaza din <i>S. sclerotiorum</i>.....	79
4. 1. Introducere.....	79
4.2. Materiale și metode	81
4.2.1. Reactivi.....	81
4.2.2. Purificarea lacazei	81
4.2.3. Prepararea aducțiilor	82
4.2.4. Măsurarea spectrelor UV-vis și de fluorescență	83
4.2.5. Măsurarea spectrelor RES	84
4.3. Rezultate și discuții.....	84
4.3.1. Purificarea lacazei albastre	84
4.3.2. Caracterizarea aducțiilor	86
4.3.3. Formarea aductului ABTS-tirozină.....	88
4.3.4. Evaluarea activităților enzimaticice	92
4.3.5. Evaluarea stabilității enzimaticice	94
4.4. Concluzii.....	96
Chapter 5. Aplicații ale lacazei din <i>S. sclerotiorum</i> în evaluarea caracterului prooxidant al unor fenoli și extracte naturale	97
5.1. Introducere.....	97
5.2. Materiale și metode.....	100
5.2.1. Reactivi.....	100
5.2.2. Purificarea hemoglobinei și a lacazei.....	101
5.2.3. Măsurarea cineticilor enzimaticice	101

5.2.4. Măsurarea activităților antioxidante și prooxidante.....	102
5.2.5. Investigarea radicalului quercetil prin spectroscopie UV-vis și RES	103
5.2.6. Prepararea și investigarea extractelor de propolis	103
5.2.7. Măsurători de voltmetrie ciclică	104
5.2.8. Investigații prin HPLC-MS și MS	104
5.2.9. Metoda Folin-Ciocalteu și metoda HAPX (hemoglobin/ascorbate peroxidase).....	105
5.2.10. Evaluarea lipoficității	106
5.2.11. Analiza statistică	106
5.3. Resultate și discuții	107
5.3.1. Caracterizarea flavonoidelor.....	107
5.3.2. Detecția unui radical în timpul ciclului catalitic folosind spectroscopia RES și UV-vis	109
5.3.3. Reactivitatea prooxidantă a flavonoidelor asupra hemoglobinei folosind lacaza	113
5.3.4. Aplicații în evaluarea antioxidantă și prooxidantă a extractelor de propolis	118
5.3.4.1. Evaluarea antioxidantă a extractelor de propolis	118
5.3.4.1. Evaluarea prooxidantă a extractelor de propolis.....	130
5.4. Concluzii.....	133
Chapter 6. Aspecte teoretice și compuși model pentru situsurile active ale lacazelor	135
6.1. Investigarea centrului metalic de tip T1.....	135
6.2. Investigarea centrelor metalice de tip T2/3.....	138
Concluzii generale	149
Referințe	151
Lista publicațiilor.....	175

Cuvinte cheie: lacază, *Sclerotinia sclerotiorum*, enzime induse, purificarea proteinelor, proteine pe bază de cupru, aduct, complecși cu cupru, radicali, prooxidant

Obiectivele tezei

Teza de față are cinci obiective principale care au fost propuse într-o formă preliminară înainte de începerea lucrării și a suferit mai multe modificări în timpul derulării tezei. Fiecare din acestea conține mai mulți pași principali, care au fost prevăzuți în proiectul tezei de cercetare sau au fost stabiliți în timpul etapelor de lucru.

1. Determinarea condițiilor optime ale condițiilor de cultură a Sclerotinia sclerotiorum în vederea obținerii unui randament mărit de lacază

- Evaluarea mai multor tipuri de medii lichide asupra producției de lacază;
- Evaluarea influenței unor parametri/condițiile importante asupra producției de lacază de ciupercă, cum ar fi: pH-ul, sursa de azot sau carbon, alți inductori;
- Evaluarea unor factori fiziologici relevanți asupra secreției de lacază, cu scopul de a determina rolul fiziologic al acesteia;

2. Izolarea, purificarea și caracterizarea lacazei din Sclerotinia sclerotiorum

- Stabilirea de protocoale adecvate pentru izolare și purificarea lacazei utilizând procedee cromatografice și electroforetice;
- Determinarea activității specifice și proprietăților biochimice (K_m , k_{cat} , pH-ul optim, termostabilitatea, selectivitatea de substrat) ale enzimei purificate;
- Caracterizarea spectrală a enzimei purificate (UV-VIS, CD, EPR, MS);

3. Elucidarea mecanismului reacțiilor catalizate de enzima pură

- Caracterizarea unor intermediari de reacție posibili și a cineticii acestora;
- Studiul interacțiunii enzimă - substrat;

4. Aplicații ale lacazei din S. sclerotiorum

- Stabilirea de protocoale adecvate pentru evaluări activităților prooxidante și antioxidante ale polifenolilor și ale unor extracte naturale;

5. Studii teoretice și experimentale ale unor compuși model pentru lacază

- Evaluarea reactivității față de unii liganzi și substraturi de lacază a unor complecși de cupru;
- Studii teoretice ale unor complecși de cupru, modele pentru centrele de cupru din lacază privind reactivitatea și comportamentul lor spectral.

Introducere generală

Un rol foarte important în metabolismul celular îl joacă proteinele care au ca și cofactor unul sau mai mulți atomi de cupru. Ele sunt implicate în fotosinteză, fosforilarea oxidativă, homeostazia ionilor metalici și în catabolismul a numeroși nutrienți. Principalele reacții în care sunt implicate proteinele cu cupru sunt cele de transfer electronic, aceasta datorită capacității cuprului de a exista în două stări de oxidare Cu^+ și Cu^{2+} . Atomul de cupru are o astfel de sferă de coordinare asigurată de structura apoproteică astfel încât trecerea de la o stare de oxidare la alta să fie fezabilă din punct de vedere termodinamic.

Cele mai simple proteine care funcționează pe bază de cupru sunt plastocianinele și azurinele, ele fiind de regulă implicate în reacții cu transfer de electroni. Alte proteine, mai complexe, cu mai mulți atomi de cupru în situsul activ cum ar fi galactozoxidaza, nitrit reductaza, ceruloplasmina, ascorbat reductaza, feredoxina, bilirubinoxidaza și nu în ultimul rând lacaza, sunt implicate în reacții de transfer a mai multor electroni, în același timp, de la un substrat redus la unul oxidat, reducându-l pe acesta din urmă.

Lacaza (p-difenol:dioxigen oxidoreductaza) este o oxidoreductază (EC 1.10.3.2) cu patru atomi de cupru în situsul activ și care catalizează oxidarea monoelectronică a patru substraturi reduse, de regulă fenoli sau amine aromatice, cuplată cu reducerea oxigenului molecular la apă. Lacaza este una din cele mai vechi enzime studiată vreodată, pentru prima dată fiind descrisă de către Yoshida în 1883 și categorisită de către Bertrand în 1895 ca fiind o oxidază care conține cupru. Totuși, doar în ultimele zeci de ani, când s-a descoperit că lacaza face parte din arsenalul de enzime implicate în degradarea lemnului de către ciupercile degradatoare, atenția față de aceste enzime a sporit mult. Un interes mai recent care a dus la studiul acestei enzime este implicarea acestia în virulența unor ciuperci fitopatogene, cum este și cazul tezei acesteia.

Actualmente, această enzimă este tema centrală a multor grupuri de cercetare, atât datorită curiozității științifice cât și a numeroaselor sale aplicații în biotehnologie și bioanalitică.

Conținutul tezei

Primul capitol descrie cele mai recente cercetari cu privire la caracteristicile generale ale structurii lacazelor, precum și cu privire la structurile și proprietățile situsurilor active, împreună cu mecanismele de reacție acceptate astăzi. Lacaza (p-difenol: dioxigen oxidoreductaza), una dintre cele mai vechi enzime descoperite, conține patru ioni de cupru în două situsuri active și catalizează oxidarea monoelectronică de substraturi, cum ar fi fenolii și derivații acestora, sau amine aromatice, cuplată cu reducerea oxigenului molecular la apă. Mecanismul catalitic a fost studiat timp de mai multe decenii, dar nu este încă complet elucidat, în special în ceea ce privește reducerea dioxigenului la apă. Caracteristicile structurale cheie ale acestei enzime sunt în curs de cercetare în mai multe grupuri de cercetare folosind tehnici, cum ar fi difracția de raze X, de electroni, spectroscopia de rezonanță electronică de spin (RES), mutageneza dirijată. Interesul mărit în studiul lacazelor se explică prin numărul mare de aplicații în biotehnologie. Distribuția lor în natură, rolul fiziologic, cele mai utilizate metode de purificare și proprietățile biochimice precum și parametrii utilizați pentru caracterizarea lor sunt, de asemenea, descrise în acest capitol. Numeroase aplicații ale lacazelor cum ar fi industria textilă, prelucrarea lemnului, producția de hârtie, industria farmaceutică, chimică și altele sunt descrise ulterior. Unele aspecte biologice cu privire la ciuperca fitopatogenă *Sclerotinia sclerotiorum* și motivele pentru folosirea acestui organism ca sursă de lacază sunt prezentate la sfârșitul capitolului. În ultima parte a capitolului, sunt discutați unii complecși de cupru utilizați ca modele pentru situsurile active ale lacazelor.

Capitolul al doilea descrie factorii care afectează producția de lacază din ciuperca fitopatogenă *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Raportul carbon/azot pare a fi de mare importanță. Mai degrabă decât un simplu mediu bogat în nutrienți cu conținut mare în azot, extractul de drojdie se comportă ca un adevărat inductor de lacază, aparent acționând printr-un mecanism de stres. Extract-ul de *Chelidonium majus*, un agent antifungic cunoscut, acționează într-o manieră similară. Datele experimentale arată că compusul (-șii) în extractul de drojdie responsabil pentru inducerea lacazei este cel mai probabil o moleculă organică hidrolizabilă. Ambele extracte reduc biomasa și numărul de scleroți, dar și o creștere a activității lacazice cu un ordin de mărime față de control. pH-ul mediului, un factor virulent bine-cunoscut pentru aceasta ciupercă, de asemenea, acționează ca un inductor de lacază adevărat, deși printr-un mecanism diferit decât cele două

extracate. Efectul pH-ului pare să fie legat de cinetica de acidifiere a mediului extracelular în timpul dezvoltării ciupercii. O serie de alți inductori de lacază cunoscuți s-au găsit că sporesc producția de lacază cel de două ori.

Capitolul trei conține informații cu privire la producerea, purificarea și caracterizarea lacazei din ciuperca fitopatogenă *Sclerotinia sclerotiorum*. Această lacază este identificată prin spectrometrie de masă, cu o acoperire secvență de 74,9% (458/577 AA), arătând că proteina este identică sau foarte omologă cu o oxidoreductază prezisă din această specie (A7EM18 în baza de date Uniprot); cea mai apropiată proteină de aceasta prezisă din proteinele omoloage anterior izolate este lacaza din ciuperca *Melanocarpus albomyces*, cu doar 35% din identitate. Caracteristicile spectrale UV-vis ale acestei lacaze o clasifică drept o lacază „galbenă”. Spectrul RES demonstrează totuși o asemănare cu lacazele albastre – având lămurit centrul de tip T1 care nu este detectabil în UV-vis. Prezența cuprului de tip T3 a fost dovedită prin spectrul de fluorescență și de banda de la 330 nm din spectrul UV-vis. Lacaza purificată are o masă moleculară aparentă de 70 kDa și este un monomer. Valorile de K_m și k_{cat} au fost determinate pentru ABTS, 2,6-dimethoxyphenol, p-fenilendiamină și guaicol și sunt tipice unui lacaze. Valoarea pH-ului optim este în jurul valorii de 4, cu excepția ABTS-ului, pentru care activitatea crește linear odată cu creșterea acidității. Activitatea lacazică mare din mediul de cultură lichid, face din *Sclerotinia sclerotiorum* o sursă utilă de lacază pentru aplicații practice.

În capitolul patru este furnizat pentru prima dată, o dovadă că lacaza „galbenă” izolată din *Sclerotinia sclerotiorum* este obținută dintr-o formă „albastră” printr-o modificare covalentă, dar reversibilă, cu un produs de natura polifenolică. În lacazele „galbene” lipsește banda tipică celor „albastre” din spectrul UV-vis, cauzată de centru de tip T1, în jurul valorii de 600 nm, dar sunt totuși oxidaze cu mai mulți atomi de cupru, cu proprietăți de lacază. După separarea polifenolilor, se obține o lacază „albastră”. Folosind ABTS-ul ca substrat pentru această enzimă „albastră”, se formează un adduct violet, cu un spectru aproape identic cu cel al aductului format din ABTS-ul radicalic și tirozină. Această modificare crește semnificativ stabilitatea și afinitatea substratului enzimei, ne acționând în calitate de mediator legat, ci printr-o activare alosterică care modifică, de asemenea, situsul de tip T1. Astfel, lacază „galbenă” din *S. sclerotiorum* este o lacază „albastră”, care se activează autocatalitic prin interacțiunea cu un substrat radicalic.

Capitolul al cincilea conține numeroase rezultate în ceea ce privește unele aplicații ale enzimei purificate în vederea evaluării proprietăților antioxidante și prooxidante ale unor fenoli și extracte de propolis. O specie tranzitorie a fost detectată cu spectroscopia UV-vis și RES în timpul oxidării catalitice a quercetinei de către lacază, această specie este desemnată ca fiind un radical

derivat de quercetină, aceasta fiind dovedit prin spectrele RES precum și pe baza spectrelor UV-vis similare cu datele raportate anterior pentru acest radical quercetil obținut prin metode neenzimatiche. Formarea și descompunerea acestei specii se corelează bine cu reactivitatea prooxidantă manifestată de flavonoide în prezența lacazei. Un protocol pentru evaluarea reactivității prooxidante a compușilor naturali este propusă pe baza rezultatelor raportate aici; acest test are avantajul utilizării unui proces relevant biologic (oxidarea hemoglobinei), precum și de a nu avea nevoie de agenți de oxidare, cum ar fi peroxidul sau superoxidul. Corelațiile, sau lipsa acestora, între parametrii activității prooxidante și potențialele redox, capacitățile antioxidante și lipofilitatea, sunt analizate. Unele metode noi pentru evaluarea activității antioxidante a extractelor naturale sunt, de asemenea, descrise. De remarcat este faptul că lacaza folosită în acest studiu are asemănări structurale și de reactivitate cu o serie de alte proteine, care include ceruloplasmina.

Ultimul capitol al tezei de doctorat cuprinde rezultatele privind modelarea moleculară a unor complecși de cupru și ale centrului T1 și experimentele care descriu reactivitatea acestora față de unii liganzi sau parteneri redox. Lacazele conțin un centru de cupru mononuclear cunoscut sub numele de "tip-1" (T1), și este considerat ca fiind sediul acceptor de electroni de la substraturi organice în timpul ciclului de catalitic. Un grup mic de lacaze sunt, de asemenea, cunoscute pentru faptul că nu dispun banda de la 600 nm și, prin urmare, nu au culoarea albastră și sunt numite "lacaze galbene". În prima secțiune este raportat utilizarea de calcule semiempirice (Zindo / S-CI), cu scopul de a simula spectrele UV-vis și alți parametrii spectrali pentru centru T1, precum și încercarea de a atribui elemente geometrice și electronice structurii care poate cauza culoarea acestei enzime. Banda de la ~ 600-nm apare în principal din transferul de sarcină de la sulf la cupru, și în această secțiune sunt identificate distorsiuni puternice pentru a permite deplasarea acesteia cu mai mult de 200 nm și/sau dispariția acesteia. În a doua secțiune, unele porfirine de cupru sunt analizate în ceea ce privește reactivitatea acestora față de unele substraturi pentru lacază și față de alți compuși activi redox. Porfirinele de cupru sunt, în general, cunoscute pentru reactivitatea mai redusă, comparativ cu omologii lor de fier. În această parte, este examinată o porfirină de cupru hidrosolubilă pentru abilitatea sa de a se angaja în reacții care implică interacțiunea axială la cupru. Deși spectrele UV-vis indică o lipsă așteptată a reactivității, spectrele RES dezvăluie o bogăție neașteptată de schimbări în structurile electronice la cupru, induse de liganzi, cum ar fi nitritul sau imidazol, dar, de asemenea, de către compuși aparent neașteptați pentru liganzi, cum ar fi acidul 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonic) (ABTS) și gaiacolul, precum și ditionit. O funcție importantă a mai

multor proteine cu cupru este de a activa O_2 și de a oxida diverse substraturi organice. Starea de oxidare Cu (III) este în general considerată a fi mai puțin accesibilă din cauza potențialului redox Cu(III)/Cu(II) extrem de pozitiv. În ultima parte a tezei sunt prezentate calcule (DFT) elaborate pentru a explora în ce măsură cupru (III) poate fi accesibil într-un mediu de coordonare relevant biologic într-un centru de cupru mononuclear, prin ruperea legăturii oxigen-oxigen în complexul de cupru. În acord cu concluziile anterioare cu privire la modelele de cupru, complexul de cupru de valență înaltă, obținut prin clivajul legăturii O-O, pare să poarte în fapt, ambele echivalente de oxidare pe liganzii lor. Suprafața de energie potențială pentru o astfel de reacție arată că în complexul de cupru cu trei histidine, clivajul legăturii O-O nu este imposibil, ci mai degrabă defavorizat termodinamic.

Concluzii generale

- Au fost determinate condițiile optime în care lacaza din *S. sclerotiorum* este produsă. Natura surselor de carbon și cele de azot precum și raportul C/N par a fi de o mare importanță pentru producția de lacază în această ciupercă. Mai degrabă decât un nutrient bogat în diverse surse de azot, extractul de drojdie se comportă ca un adevărat inductor de lacază, acționând aparent printr-un mecanism de stres. Extractul de *Chelidonium majus*, un agent antifungic bine cunoscut, acționează într-o manieră similară. pH-ul mediului, un factor bine-cunoscut în virulență fitopatogenă pentru aceasta ciuperca, acționează de asemenea, ca un adevărat inductor de lacază, deși printr-un mecanism diferit. Efectul pH-ului pare să fie legat de cinetica de acidifiere a mediului extracelular în timpul dezvoltării ciupercii. Astfel, sunt arătate dovezi că această enzimă este implicată în căi de stres, cel mai probabil, implicate și în virulență fitopatogenă.
- Lacaza din *S. sclerotiorum* a fost izolată și purificată, iar proprietățile sale catalitice au fost caracterizate. În mod special, deși această lacază a fost considerată drept "lacază galbenă" pe baza spectrului UV-VIS, centrul de cupru de tip T1 responsabil pentru culoarea albastră a lacazelor este totuși observabil în spectrul RES. Măsura în care lacaza din *S. sclerotiorum* poate permite, definirea unui nou tip de lacază (nici "albastră", nici "galbenă") rămâne a fi explorat, mai ales că pentru majoritatea lacazelor galbene spectrele RES nu au fost raportate; o astfel de clasă ar trebui să fie confirmată.
- S-au furnizat dovezi directe pentru cazul în care o lacază albastră poate fi convertită într-o formă galbenă *in vitro* de către modificarea covalentă la situsul T1, cauzată de metaboliți ai lacazelor. Mai mult decât atât, această modificare autocatalitică îmbunătățește semnificativ proprietățile structurale și catalitice ale enzimei. În esență, lacaza galbenă din *S. sclerotiorum* este intrinsec o oxidaza pe bază de cupru, albastră care este activată la prima interacțiune cu un substrat polifenolic. Un rest de tirozină a fost identificat în apropierea situsul T1, care poate fi ținta unor astfel de modificări.
- O specie tranzitorie poate fi detectată cu spectroscopia UV-vis și RES în timpul oxidării catalitice a enzimei de către lacază, această specie este desemnată ca fiind un radical quercetil, fapt bazat atât pe spectrele RES, precum și pe baza asemănarilor cu datele

spectrale UV-vis raportate anterior în literatură. În plus, această specie se corelează bine cu reactivitatea prooxidantă manifestată de flavonoide în prezența lacazei. Pe baza acestor rezultate, este propus un protocol care evaluează reactivitatea prooxidantă a compușilor naturali, care are avantajele utilizării unui proces relevant biologic (oxidarea hemoglobinei), precum și de a nu avea nevoie de agenți de oxidare, cum ar fi peroxidul sau superoxidul. Sunt discutate, de asemenea, diverse corelații, sau lipsa acestora, între parametri obținuți cu acest protocol și potențialul redox, activitatea antioxidantă, lipofilicitatea. De remarcă este faptul că lacaza utilizată în acest studiu are asemănări structurale și de reactivitate cu o serie de alte proteine, inclusiv ceruloplasmina și deține, de asemenea, similitudini de reactivitate cu peroxidazele care conțin hem. În plus a fost propusă, o nouă scară a capacității antioxidante care este mai informativă și mai eficientă, și se obține prin aplicarea PCA-ului pe profilele cinetice de stingere a DPPH-ului (2, 2-difenil-1-picrylhidrazil). În scopul acesta, a fost propus un parametru adimensional numit factor de quercetină (QF), care se definește prin raportul dintre echivalentul de quercetină în mg/L al probei analizate și concentrația de material corespunzătoare în mg/L. Aplicarea acestei metodologii la alte extracte naturale va confirma această nouă metodă de evaluare a activității antioxidante.

- Chimia coordinativă a porfirinelor de cupru este evident mult mai complexă decât a fost descrisă anterior, iar spectroscopia RES, și nu doar spectroscopia UV-vis este metoda de alegere pentru investigarea reactivității acestora.
- Folosind diverse metode computaționale au fost identificate unele modificări structurale de torțiune și elongare care permit un centru tri-coorddat de cupru “*albastru*” să își piardă banda caracteristică de la 600 nm, care este responsabilă pentru culoarea albastră a lacazelor comune, atât prin deplasarea acesteia cu aproximativ 200 nm cât și în unele cazuri prin scăderea coeficientului de extincție. Cu toate acestea, calculele DFT sugerează că astfel de modificări ar putea fi, de asemenea, detectate și în spectroscopia RES.
- Spre deosebire de stările de înaltă-valență a complexiilor de fier sau de mangan, cele a complexiilor de cupru par a nu fi realizabile prin liganzi de tip peroxo- chiar dacă clivajul O-O pare să implice în sine bariere reduse de energie; acest lucru poate fi interpretat ca fiind cauzat de diferențe în potențialul redox, ceea ce face ca liganzii de tip hidroxo, peroxo și oxo să fie mai ușor de oxidat decât ionul de Cu (II).

Lista publicațiilor pe tema de doctorat

1. Moț A.C., Silaghi-Dumitrescu R., Sarbu C., *Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data*, Journal of Food Composition and Analysis 24 (2011) 516–522;
2. Lupan A., Matyas C., Moț A.C., Silaghi-Dumitrescu R., *Can geometrical distortions make a laccase change color from blue to yellow?*, Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia, 56 (2011) 231-238;
3. Moț A.C., Pârvu M., Damian G., Irimie F.D., Darula Z., Medzihradzky K.F., Brem B., Silaghi-Dumitrescu R., *A “yellow” laccase with “blue” spectroscopic features, from Sclerotinia sclerotiorum*, Process Biochemistry 47 (2012) 968–975;
4. Moț A.C., Syrbu S.A., Makarov S.V., Damian D., Silaghi-Dumitrescu R., *Axial ligation in water-soluble copper porphyrinates: contrasts between EPR and UV-vis*, Inorganic Chemistry Communications 18 (2012) 1-3;
5. Imre A., Moț A.C., Silaghi-Dumitrescu R., *Exploring the possibility of high-valent copper in models of copper proteins with a three-histidine copper-binding motif*, Central European Journal of Chemistry 10 (2012) 1527-1533;
6. Moț A.C., Silaghi-Dumitrescu R., *Laccases: complex architectures for one-electron oxidations*, Biochemistry (Moscow), accepted;
7. Moț A.C., Damian G., Sarbu C., Silaghi-Dumitrescu R., *Redox reactivity in propolis: direct detection of free radicals in basic medium and interaction with hemoglobin*, Redox Report 14 (2009) 267-274;