
Cu²⁺ įtaka mikromicetų fenoloksidaziniam aktyvumui

Vita Raudonienė

Botanikos institutas,
Žaliųjų ežerų g. 49,
LT-2021 Vilnius, Lietuva

Ištirta Cu²⁺ įtaka mikromicetų *Galactomyces geotrichum*, *Myrothecium verrucaria*, *Mortierella verticillata*, *Dipodascus armillariae*, *Dipodascus albidus*, *Geotrichum candidum*, *Oedocephalum albidum*, *Mortierella hyalina*, *Hormonema prunorum*, *Papularia sphaerosperma*, *Aspergillus repens*, *Sporotrichum pruinosum* biomasės augimui, jų fenoloksidazių – peroksidazės, lakazės ir tirozinazės – aktyvumui.

Nustatyta, kad 5 mM CuCl₂ koncentracija Čapeko terpėje sumažino visų tirtų mikromicetų biomasės kiekį, išskyrus *Dipodascus albidus* ir *Geotrichum candidum*, kurių biomasės kiekis padidėjo 1,01 ir 1,07 karto, palyginus su kontrole. Didesnė (10 mM) Cu²⁺ koncentracija sumažino visų tirtų mikromicetų biomasės kiekį.

Esant 5 mM vario koncentracijai aplinkoje, daugumos mikromicetų tirozinazinis aktyvumas buvo skatinamas; tik kai kurių mikromicetų jis buvo inhibuojamas. Ištirta, kad didžiausiu tirozinaziniu aktyvumu dėl 5 mM Cu²⁺ įtakos išsiskyrė *Papularia sphaerosperma*, kurio didžiausias aktyvumas (62,67 sąl.v./ml) buvo nustatytas 8-ą jo kultivavimo parą. Įterpus į terpę 10 mM CuCl₂, visų tirtų mikromicetų tirozinazinis aktyvumas buvo skatinamas. Didžiausiu tirozinaziniu aktyvumu išsiskyrė *Mortierella verticillata*, *Myrothecium verrucaria* ir *Sporotrichum pruinosum* (atitinkamai 120,35, 110,57 ir 107,89 sąl.v./ml), pasiekdami aktyvumo maksimumą 21-ą kultivavimo parą.

5 mM CuCl₂ koncentracija nevienodai paveikė mikromicetų lakazinį aktyvumą: vienu padidino, kitų – sumažino, išskyrus *Mortierella verticillata*, kurio aktyvumas, palyginus su kontrole, buvo didesnis (ekst. koef. 0,094) visą kultivavimo eigą. Visų tirtų mikromicetų lakazinis aktyvumas terpėje su 10 mM Cu²⁺ padidėjo, išskyrus *Myrothecium verrucaria* (ekst. koef. 0,01) ir *Oedocephalum albidum* (ekst. koef. 0,043). Didžiausiu lakaziniu aktyvumu pasižymėjo *Galactomyces geotrichum* (ekst. koef. 0,109) ir *Sporotrichum pruinosum* (ekst. koef. 0,146).

Visų tirtų mikromicetų peroksidazinis aktyvumas terpėje su 5 mM Cu²⁺ buvo nedidelis (1,56 a.v./ml), o esant 10 mM Cu²⁺ terpėje, fermentinis aktyvumas visai nepasireiškė.

Raktažodžiai: mikromicetai, Cu²⁺, peroksidazė, lakazė, tirozinazė

ĮVADAS

Ligninas ir celiuliozė yra pagrindinės sudėtinės augalų atliekų dalys ir nuo jų irimo proceso labai priklauso anglies junginių apykaita gamtoje. Mikromicetai – fenoloksidazių producentai vaidina svarbų vaidmenį augalų atliekų degradacijos procese. Pagrindiniai mikromicetų gaminami fermentai, dalyvaujantys lignino degradacijos procese, yra fenoloksidazės: lignino peroksidazė, Mn peroksidazė, lakazė. Šiame procese taip pat svarbus tirozinazės, katalazės ir gliukozoksidazės vaidmuo.

Fermentų aktyvumui ir augalų atliekų irimo eigai didelę įtaką turi įvairūs ekologiniai veiksniai. Tarp kitų veiksnių svarbus vaidmuo tenka įvairios kilmės cheminėms medžiagoms, kurios aplinkoje mikroorganizmus veikia skirtingai. Sunkieji metalai, esantys dirvoje, gali turėti įtaką ekstraląstelių fermentų sekrecijai ir aktyvumui.

Sunkieji metalai labai neigiamai veikia dirvos mikroorganizmus. Iš visų dirvos organizmų grybai yra atspariausi sunkiųjų metalų taršai. Įrodyta, kad grybai dėl specifinių mechanizmų gali toleruoti dideles toksines metalų koncentracijas: metalų jonų pašalinimas iš citoplazmos (biosorbicija, viduląstelinis surišimas, metilimas ir kt.) bei jų gebėjimas toleruoti dideles koncentracijas ląstelės viduje. Pastarasis dažnai priklauso nuo specialiųjų genų ir proteinų indukcijos (Martino et al., 2000; Gadd Geoffrey et al., 1998).

Tam tikri sunkieji metalai yra reikalingi grybų metabolizmui: vieni labiau (varis, geležis, manganas, molibdenas, cinkas ir nikelis), kiti mažiau (chromas, kadmis, gyvsidabris ir sidabras). Grybai jautriai reaguoja net į mažus metalų kiekius, esančius medienoje ir dirvoje. Šių metalų gali būti nuo labai mažų kiekių iki toksinių koncentracijų. Toksinės metalų koncentracijos, dažnai pasitaikančios medienoje ar

dirvoje, yra pramoninės taršos arba įvairios neorganinės medžiagos, naudojamoms apsaugoti medienai, rezultatas.

Nors grybų metabolizmui reikia tam tikro kiekio metalų, tie patys metalai, padidėjus jų koncentracijai vos kelis kartus, dažnai pasidaro toksiniai (Jellison et al., 1997). Kai kurie sunkieji metalai (varis, sidabras) kaip nuodai veikia fermentinę sistemą net esant mažoms metalų koncentracijoms. Ir druskų ($HgCl_2$, $CuCl_2$, $AgNO_3$), ir organinių junginių sudėtyje jie suriša – SH grupes, taip pakeisdami fermentų tretinę ir ketvirtinę struktūrą. Be to, yra blokuojama kofermento A merkaptio-funkcinė grupė (Шлегель, 1987).

Svarbus mikroelementas varis, reikalingas grybų augimui ir fiziologiniams procesams. Jis yra kai kurių grybų fermentų aktyvintojas (pvz., oksidazių). Visi grybai turi šio elemento specifinius transporto mechanizmus. Varis reaguoja su grybų fermentų merkaptio- ir kitomis funkcinėmis grupėmis, todėl grybo aplinkoje jis yra būtinas ląstelių metabolizmui palaikyti ir organizmui išlikti. Tačiau didelės vario koncentracijos inhibuoja grybų augimą. Manoma, kad augimas inhibuojamas ląstelės membranoje, kurioje varis konkuruoja su kitų jonų transportu. Atlikti tyrimai rodo, kad varis gali sukelti genetinius grybų pokyčius, t. y. mutagenzę (Jellison et al., 1997). Vario yra fermentų (tirozinazės, lakazės), dalyvaujančių augalų atliekų lignino degradacijos procese, sudėtyje (Score et al., 1997).

Šio darbo tikslas buvo ištirti mikromicetų – perspektyviausių lignino–celiuliozės komplekso ardytojų fenoloksidazių (peroksidazės, lakazės ir tirozinazės) aktyvumo pokyčius, pridėjus į terpę 5 ir 10 mM $CuCl_2$. Siekta išaiškinti natūraliomis sąlygomis, patekus mikromicetams į aplinką, kurioje yra skirtingos Cu koncentracijos, kai kurių, pirmiausia Cu turinčių, fermentų reakciją į jas. Šių fermentų aktyvumas daugiausia sąlygoja augalų atliekų irimo procesus gamtoje.

METODIKA

Peroksidazės, lakazės ir tirozinazės substratų specifiskumas buvo nustatinėjamas Lyro metodu (Lyr, 1958). Cu^{2+} įtaka peroksidazės, lakazės ir tirozinazės aktyvumui nustatyta mikromicetus – fenoloksidazių producentus kultivuojant n-Čapeko terpėje (kontrolinis variantas) ir Čapeko terpėje, į kurią buvo įterpta 5 ir 10 mM $CuCl_2$. Bandyuose buvo panaudoti mikromicetai: *Galactomyces geotrichum* (Butl. et Petersen) Redhead et Malloch, *Myrothecium verrucaria* (Alb. et Schweinitz) Ditmar ex Fr., *Mortierella verticillata* Linnem, *Dipodascus armillariae* W. Gams, *Dipodascus albidus* Lagerh, *Geotrichum candidum* Link: Fr., *Oedocephalum albidum* (Preuss)

Sacc., *Mortierella hyalina* Hair W.Gams, *Hormonema prunorum* (Dennis et Buhagiar) Hermanides-Nijhof, *Papularia sphaerosperma* (Pers.) Höhn, *Aspergillus repens* de Bary, *Sporotrichum pruinatum* Gilman et Abbott. Bandytas atliktas optimaliomis laboratorinėmis sąlygomis kultivuojant mikromicetus 21 parą 28°C temperatūroje. Po to buvo nustatinėjamas biomasės prieaugis, peroksidazinis, lakazinis ir tirozinazinis aktyvumas.

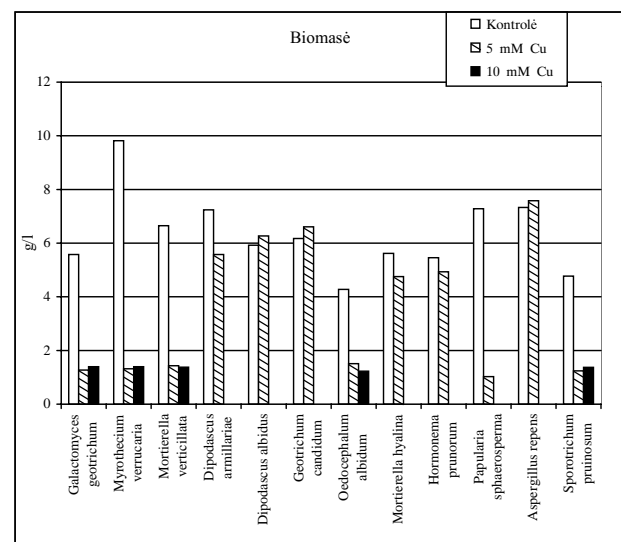
Peroksidazinis aktyvumas (PA) nustatytas o-dianizidino reaktyvu (Гудкова, Дегтярь, 1986), lakazinis – p-fenilendiaminohidrochloridu (Ravin, Harvard, 1965), o tirozinazinis – tirozinu (Ермаков, 1987).

REZULTATAI IR DISKUSIJA

Cu įtaka mikromicetų biomasės prieaugiui. Gautieji rezultatai parodė (1 pav.), kad didžiausias biomasės kiekis buvo nustatytas po *Myrothecium verrucaria*, *Aspergillus repens*, *Dipodascus armillariae* ir *Papularia sphaerosperma* (atitinkamai 9,82; 7,33; 7,24; 7,28 g/l) kultivavimo.

Įterpus į terpę 5 mM $CuCl_2$, nustatytas visų tiriamų mikromicetų biomasės kiekio sumažėjimas, išskyrus *Dipodascus albidus* ir *Geotrichum candidum*, kurių biomasės kiekis šiek tiek padidėjo (1,01 ir 1,07 karto, palyginus su kontrole). Dėl 10 mM Cu visų tirtų mikromicetų biomasės kiekis sumažėjo nuo 3,48 (*Oedocephalum albidum*) iki 7,01 (*Myrothecium verrucaria*) karto, palyginus su kontrole.

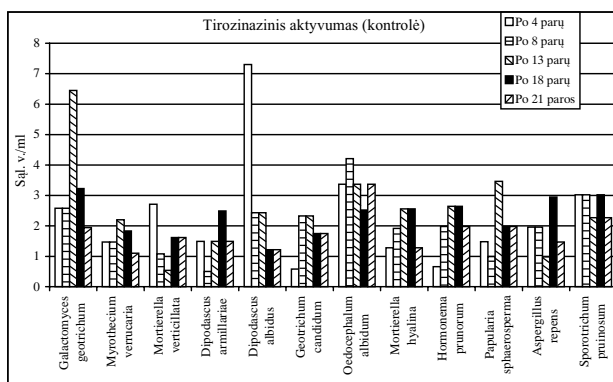
Cu įtaka mikromicetų tirozinaziniam aktyvumui. Mikromicetų tirozinazinis aktyvumas, kultivuojant juos n-Čapeko terpėje, buvo skirtingas. *Dipodascus albidus* tirozinazinis aktyvumas (7,3 sąl.v./ml) po 4-ių kultivavimo parų buvo didžiausias. Antras ti-



1 pav. Vario įtaka mikromicetų biomasės prieaugiui
Fig. 1. The influence of copper on biomass increase in micromycetes

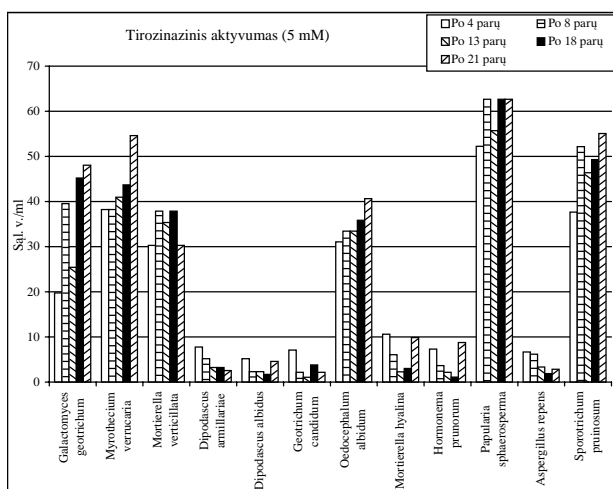
rozinazinio aktyvumo maksimumas (6,45 sąl.v./ml) nustatytas po mikromiceto *Galactomyces geotrichum* kultivavimo 13 parų. Visų kitų tirtų mikromicetų tirozinazinis aktyvumas buvo mažesnis. Mikromiceto *Dipodascus armillariae* mažiausias aktyvumas (0,5 sąl.v./ml) nustatytas po 8-ių kultivavimo parų. Tai rodo, kad skiriasi kai kurių mikromicetų fiziologinės savybės, jų micelio augimo trukmė bei po to vykstantys grybienos senėjimo ir kitokie procesai (2 pav.).

Tyrimai parodė, kad didžiausiu tirozinaziniu aktyvumu dėl 5 mM Cu įtakos išsiskyrė *Papularia sphaerosperma*: aktyvumo maksimumas (62,67 sąl.v./ml) nustatytas 8-ą jo kultivavimo parą, 13-ą kultivavimo parą sumažėjo iki 55,71, 18-ą ir 21-ą kultivavimo parą vėl pasiekė 62,67 sąl.v./ml (3 pav.). Šis aktyvumas padidėjo 31,6 karto, palyginus su kontrole. Didelis tirozinazinis aktyvumas 21-ą kultivavimo parą



2 pav. Mikromicetų tirozinazinis aktyvumas n-Čapeko terpėje

Fig. 2. Tyrosinase activity of micromycetes in n-Czapek medium



3 pav. 5 mM vario įtaka mikromicetų tirozinaziniam aktyvumui

Fig. 3. The influence of 5 mM copper on the activity of tyrosinase in micromycetes

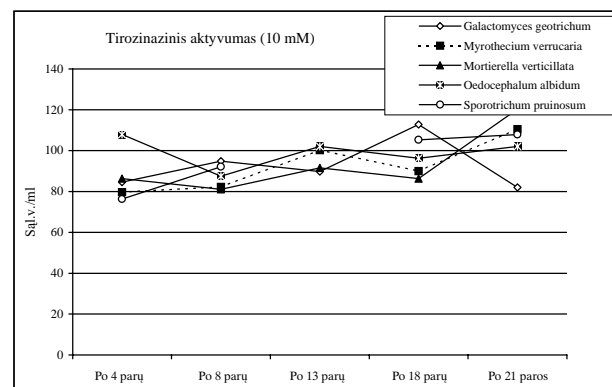
nustatytas ir kitų mikromicetų: *Galactomyces geotrichum*, *Myrothecium verrucaria*, *Oedocephalum albidum*, *Sporotrichum pruinosum* (atitinkamai 48,04; 54,63; 40,64; 55,07 sąl.v./ml), arba 24,8; 49,7; 12,1; 24,3 karto, palyginus su kontrole). Mikromiceto *Homonema prunorum* tirozinazinis aktyvumas kultivavimo eigoje buvo permainingas: nuo 4-os kultivavimo paros (7,31) mažėjo ir 18-ą kultivavimo parą buvo 1,1 sąl.v./ml. Vėliau aktyvumo maksimumą pasiekė 21-ą kultivavimo parą (8,77 sąl.v./ml), arba padidėjo 4,4 karto, palyginus su kontrole). Mikromicetų *Dipodascus albidus* ir *Geotrichum candidum* tirozinazinis aktyvumas sumažėjo atitinkamai 1,1 ir 2,1 karto, palyginus su kontrole.

Šie tirozinazinio aktyvumo pokyčiai rodo, kad patekus mikromicetams į aplinką, kurioje yra įvairios vario koncentracijos, Cu turinčio fermento aktyvumas priklausomai nuo mikromiceto rūšies savybių kito įvairiai. Esant 5 mM Cu aplinkoje, daugumos mikromicetų tirozinazinis aktyvumas buvo skatinamas; tik kai kurių mikromicetų jis buvo inhibuojamas arba permainingesnis.

Tyrimai parodė, kad įterpus į terpę 10 mM CuCl₂ visų tirtų mikromicetų tirozinazinis aktyvumas buvo skatinamas. Tai matyti palyginus aktyvumus su kontrole ir su 5 mM CuCl₂ koncentracija (4 pav.).

Didžiausiu tirozinaziniu aktyvumu (120,35) išsiskyrė *Mortierella verticillata*, *Myrothecium verrucaria* (110,57) ir *Sporotrichum pruinosum* (107,89 sąl.v./ml), pasiekdami aktyvumo maksimumą 21-ą kultivavimo parą. Mikromiceto *Oedocephalum albidum* aktyvumo maksimumas (107,94 sąl.v./ml) nustatytas jau po 4-ių kultivavimo parų. Tai 3,5 karto daugiau, palyginus su jo kultivavimu terpėje su 5 mM CuCl₂, ir 32 kartus, palyginus su kontrole. Mikromiceto *Galactomyces geotrichum* aktyvumo maksimumas (112,82 sąl.v./ml) nustatytas po 18 jo kultivavimo parų.

Fermentų aktyvumas keičiasi priklausomai nuo grybo augimo ir sporuliacijos. Eksponentinėje augi-

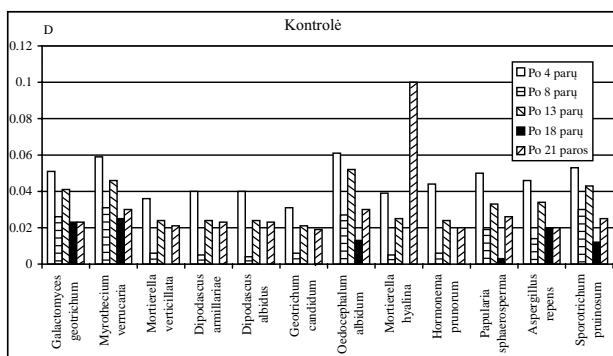


4 pav. 10 mM vario įtaka mikromicetų tirozinaziniam aktyvumui

Fig. 4. The influence of 10 mM copper on the activity of tyrosinase in micromycetes

mo fazėje (labai greitas grybo augimas) grybo fermentinis aktyvumas paprastai yra didžiausias (5–7 d.). Generatyvinėje fazėje (sporų susidarymas) fermentinis aktyvumas mažėja. Sporuliacijai baigiantis (po 10 d.) fermentinis aktyvumas vėl gali padidėti (Ахметов, Кобыльский, 1989).

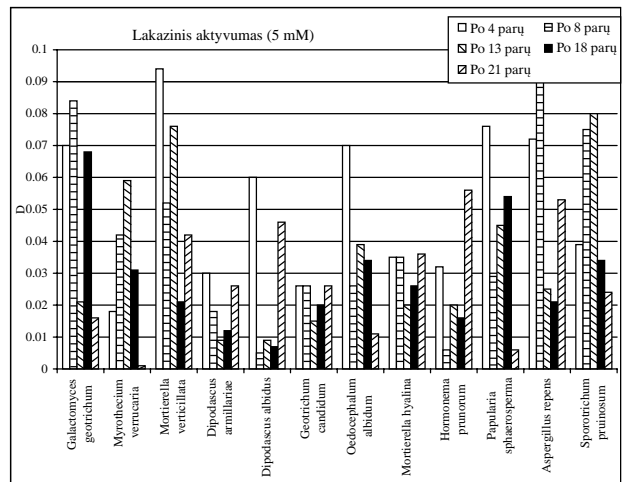
Cu įtaka mikromicetų lakaziniam aktyvumui. Nustatyta, kad mikromicetų lakazinis aktyvumas n-Čapeko terpėje buvo nedidelis ir įvairus. Didesniu lakaziniu aktyvumu išsiskyrė *Oedocephalum albidum*, *Myrothecium verrucaria* ir *Sporotrichum pruinosum* po 4-ių kultivavimo parų (atitinkamai ekst. koef. 0,061, 0,059 ir 0,053). Kitų mikromicetų šis aktyvumas buvo mažesnis ir kultivavimo eigoje palaiptiesni mažėjo (5 pav.).



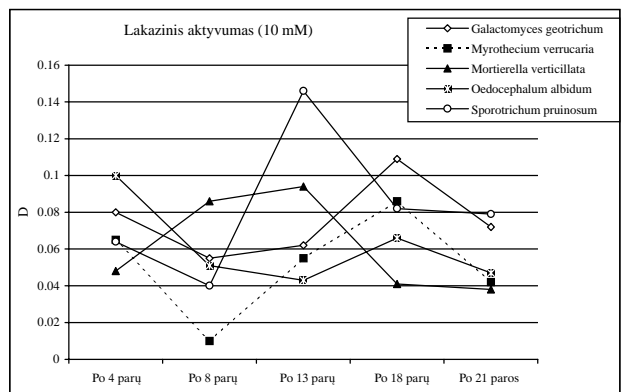
5 pav. Mikromicetų lakazinis aktyvumas n-Čapeko terpėje
Fig. 5. Laccase activity of micromycetes in n-Czapek medium

5 mM CuCl₂ nevienodai paveikė mikromicetų lakazinį aktyvumą: vieni padidino, kitų – sumažino, išskyrus *Mortierella verticillata*, kurio aktyvumas buvo didesnis (palyginus su kontrole) visą kultivavimo eigą (po 4-ių kultivavimo parų jis buvo didžiausias, ekst. koef. 0,094). *Aspergillus repens* lakazinis aktyvumas (ekst. koef. 0,094) 8-ą kultivavimo parą taip pat buvo didelis. Kitų tirtų mikromicetų aktyvumas kultivuojant buvo nedidelis ir kito nuo 0,005 iki 0,084, o mikromiceto *Myrothecium verrucaria* – mažiausias (ekst. koef. 0,001) 21-ą kultivavimo parą (6 pav.).

Visų tirtų mikromicetų lakazinis aktyvumas terpėje su 10 mM Cu padidėjo, išskyrus *Myrothecium verrucaria* 8-ą (ekst. koef. 0,01) ir *Oedocephalum albidum* (ekst. koef. 0,043) 13-ą kultivavimo parą (7 pav.). Šis aktyvumas sumažėjo 3,1 ir 1,2 karto, palyginus su kontrole. Didžiausiu lakaziniu aktyvumu pasižymėjo *Galactomyces geotrichum* (ekst. koef. 0,109) 18-ą ir *Sporotrichum pruinosum* (ekst. koef. 0,146) 13-ą kultivavimo parą. Kitų tirtų mikromicetų lakazinis aktyvumas dėl 10 mM Cu įtakos nežymiai padidėjo.



6 pav. 5 mM vario įtaka mikromicetų lakaziniam aktyvumui
Fig. 6. The influence of 5 mM copper on the activity of laccases in micromycetes



7 pav. 10 mM vario įtaka mikromicetų lakaziniam aktyvumui
Fig. 7. The influence of 10 mM copper on the activity of laccases in micromycetes

Cu įtaka mikromicetų peroksidaziniam aktyvumui. Visų tirtų mikromicetų peroksidazinis aktyvumas terpėje su 5 mM Cu buvo nedidelis, mikromicetų *Galactomyces geotrichum*, *Dipodascus albidus*, *Mortierella verticillata*, *Homonema prunorum*, *Papularia sphaerosperma*, *Aspergillus repens*, *Sporotrichum pruinosum* – 1,56 a.v./ml, o terpėje su 10 mM Cu²⁺ – nepasireiškė. Tai priešingas reiškinys negu terpėje su Cr⁶⁺ (Raudonienė, 2001), kuris aplinkoje labai suaktyvino visų tirtų mikromicetų peroksidazinį aktyvumą.

Daroma išvada, kad aplinkoje Cu²⁺ skatino mikromicetų, išskyrus pavienius, tirozinazinį aktyvumą, esant 5 mM Cu²⁺, ir visų, esant 10 mM Cu²⁺. Dėl 5 mM CuCl₂ įtakos mikromicetų lakazinis aktyvumas buvo įvairus: vieni stabdomas, kitų skatinamas. Didesnė, 10 mM Cu²⁺, koncentracija skatino daugu-

mos mikromicetų lakaziniį aktyvumą, išskyrus *Myrothecium verrucaria* ir *Oedocephalum albidum*.

Įvairios vario koncentracijos mažai paveikė peroksidazės aktyvumą. Matyt šis elementas terpėje nesukelia oksidacinių procesų, kuriuos katalizuoja peroksidazė. Terpė su Cu²⁺ turėjo įtakos grybų fiziologinėms savybėms, augimui, sporuliacijai ir fermentiniam aktyvumui.

Gauta
2002 04 17

Literatūra

- Gadd Geoffrey M., Gharieb Mohammed M., Ramsay Lynn M., Sayer Jacqueline A., Whatley Amanda R., White Christopher. Fungal proceses for bioremediation of toxic metal and radionuclide pollution. Pap. Biochem. Bioremediat. by Fungi: Meet., Belgrave Square, 21 May, 1997. *J. Chem. Technol. and Biotechnol.* 1998. N 4. P. 364–366.
- Jellison J. et al. The Role of Cations in the Biodegradation of Wood by the Brown Rot Fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 1997. Vol. 39. N 2–3. P. 165–179.
- Lyr H. Über den Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen bei höheren Pilzen und die Bedeutung dieser Enzyme für die Bavendamm Reaktion. *Planta.* 1958. Vol. 50(3). P. 359–370.
- Martino E. et al. Influence of heavy metals on production and activity of pectinolytic enzymes in ericoid mycorrhizal fungi. *Mycological Research.* 2000. Vol. 104. N 7. P. 825–833.
- Raudonienė V. Properties of micromycetes – phenoloxidase producers. *Ekologija.* 2001. Nr. 2. P. 46–50.
- Ravin H., Harvard M. Rapid test for hepatolenticular degeneration. *The Lancet.* 1965. Vol. 270. N 6920. P. 726–727.
- Score A., Palfreyman J., White N. Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 1997. Vol. 39. N 2–3. P. 225–233.
- Ахметов А. А., Кобыльский Г. И. Гидролитические ферменты фитопатогенного гриба *Sep-toria nodorum* Berk. Активность полигалактуроназы, эндо- и экзо-β-1,4-глюканаза, β-глюкозидазы и ксиланазы в культуре гриба. *Вопр. защиты с.-х. раст. и животных от болезней.* Алма-Ата, 1989. С. 68–75.

- Гудкова Л. В., Дегтярь Р. Г. *Ферменты в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве.* Киев: Наукова думка, 1986. С. 172.
- Ермаков А. И. *Методы биохимического исследования растений.* Ленинград: Агропромиздат, 1987. С. 430.
- Шлегель Г. *Общая микробиология.* Москва: Мир, 1987. С. 204.

Vita Raudonienė

THE INFLUENCE OF CU²⁺ ON THE PHENOLOXIDASE ACTIVITY OF MICROMYCETES

S u m m a r y

The influence of copper on biomass increase and on the activity of phenoloxidases (peroxidase, lacase and tyrosinase) in the micromycetes: *Galactomyces geotrichum*, *Myrothecium verrucaria*, *Mortierella verticillata*, *Dipodascus armillariae*, *Dipodascus albidus*, *Geotrichum candidum*, *Oedocephalum albidum*, *Mortierella hyalina*, *Hormonema prunorum*, *Papularia sphaerosperma*, *Aspergillus repens*, *Sporotrichum pruinosum* was studied.

The concentration of 5 mM Cu²⁺ stimulated the tyrosinase activity of almost all micromycetes; only in some species of micromycetes it was inhibited. The highest tyrosinase activity was observed in *Papularia sphaerosperma*, and its maximum was reached (62.67 conditional unit/ml) on the 8th day of cultivation. The concentration of 10 mM CuCl₂ was found to stimulate the tyrosinase of all the micromycetes studied. The highest tyrosinase activity was shown by *Mortierella verticillata*, *Myrothecium verrucaria* and *Sporotrichum pruinosum* (120.35, 110.57 and 107.89 cu/ml, respectively); the maximum of the activity was reached on the 21st day of cultivation.

The influence of 5 mM CuCl₂ on the laccase activity of various micromycetes was different, except *Mortierella verticillata*, in which the activity was higher (ext. coef. 0.094) in comparison with the control in the further course of cultivation. The concentration of 10 mM Cu²⁺ stimulated laccase activity of all micromycetes studied, except *Myrothecium verrucaria* (0.01) and *Oedocephalum albidum* (ext. coef. 0.043). The highest laccase activity was observed in *Galactomyces geotrichum* (0.109) and *Sporotrichum pruinosum* (ext. coef. 0.146).

The peroxidase activity of all micromycetes cultivated in a medium containing 5 mM Cu²⁺ was low (1.56 u/ml). In the medium with the concentration of 10 mM Cu²⁺ this enzymatic activity did not manifest at all.

Key words: micromycetes, Cu²⁺, peroxidase, laccase, tyrosinase