

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

 Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar

Alkalmazott biotechnológia szakirány

Enzimológia

**Lakkáz enzimek**

Készítették:

Holub Eszter

Petrovai Noémi

Száraz-Nagy Réka

Tihanyi Fanni

**2019**

## Bevezetés

A lakkázok a kék, több-rézatomot tartalmazó enzimek családjába (blue multi-copper enzyme family) tartoznak, oxidoreduktázok. Az enzimet először az 1800-as évek végén a lakkszömörce gyantájából mutatták ki Japánban, innen ered a neve, és azóta több különböző organizmusban is megfigyelték jelenlétüket, így gombákban, baktériumokban, rovarokban és növényekben.

## Szerkezet, működési mechanizmus

Az enzim rézatom kofaktorokat tartalmaz, melyek a működéséhez elengedhetetlen fontosságúak. A 4 darab rézatom 3 oxidációs helyen helyezkedik el az enzimen belül, ezeket T1, T2 és T3-as helyeknek nevezzük. A T1-es helyen 1 rézatom található (ez adja a kék színt a nyugvó, oxidált állapotban) és 2 hisztidin nitrogén atomja stabilizálja a szerkezetben. Esetenként egy axiális helyzetű ligandummal is rendelkezhet, mely általában metionin, ami kén atomjának köszönhetően vesz részt a réz koordinációjában. A gomba eredetű lakkázokban fenilalanin vagy leucin található ezen a helyen, amik nem vesznek részt a koordinációban, így szabadon hagyják az axiális pozíciót a szubsztrát molekula számára és segítik annak orientációját. A T2 helyen egy, míg a T3 helyen 2 rézatom (ellentétes spinűek) található. A T2/T3 helyek egy klasztert alkotnak (a rézatomok szabályos háromszögben helyezkednek el), ami a protein belsejében található. Ezeket a rézatomokat is hisztidinek nitrogén atomjai stabilizálják (T3 rézatomokat 3-3, a T2 rézatomot 2 His és egy ion, valószínűleg kloridion) a fehérjén belül. A T1 hely és a klaszter közti kapcsolatot egy tripeptid teremti meg (His-Cys-His).

Az enzim 3 doménből áll, melyek mind béta-hordó szimmetriájúak. A T1 hely a hármas doménben, míg a rézklaszter a hármas és egyes domén érintkezési felületénél található. A kettes doménben található a szubsztrát kötő hely. A két hely (T1 és T2/T3 klaszter) más feladatot végez. A T1 a protein felszínéhez közel található, ide kötődik be az elektron donor (szerves) szubsztrát a kettes doménbeli 206os helyen lévő aszparaginhoz H-híd kötésen keresztül. A molekula 1 elektront ad át a 458as hisztidin nitrogén atomjának(Mehra et al.). Az elektron általában a szubsztrát hidroxil vagy amino csoportjáról származik (ha van ilyenje). A T1 helyről az elektron a klaszterhez vándorol, ahol egy oxigén molekula 4 elektron felvételével 2 vízzé alakul. A klaszterhez 2 csatorna vezet, egy keskeny a T2 rézhez és egy széles a T3 egyik rézatomjához, melyek megkönnyítik a szubsztrát bejutását és a termék távozását. A szerves termék molekula oxidáltságát a T1 réz és a szubsztrát közti redoxpotenciál különbség határozza meg, mely több faktortól is függ, de mindenekelőtt a lakkáz eredetétől (a gomba eredetűek redox potenciálja magasabb, mint a nem gomba eredetűeké feltehetően az axiális ligand hiánya miatt) és a szubsztráttól. A lakkázok nem képesek a nem fenolos szubsztrátokat oxidálni, ha azok redox potenciálja nagyobb, mint 1,06 V.

A fehérje 520-550 aminosavból áll, 60-70 kDa molekulatümegű. A rézatomok körüli szerkezet evolúciósan konzervált, nagyfokú egyezést mutat a különböző eredetű lakkázok között.

Az enzim rendkívül sokféle elektrondonor szubsztrátot képes befogadni, aromás vegyületeket (o- és p-difenolok, aminofenolok, aszkorbinsav, metoxi-fenolok, hidroxi-indolok, aril származékok…), ketonokat, sőt még szervetlen vegyületek, ionok oxidációját is képesek katalizálni (pl.: mangánII-mangánIII, vasII-edta-vasIII-edta átalakulások), azonban a tirozint nem képes oxidálni. Ez azért fontos, mert extraceluláris enzimek révén a tirozináz és a lakkáz egyaránt megtalálható a fermentlében, valamint szubsztrátspektrumuk nagymértékben átlapol, így, ha olyan szubsztrátot választunk, mely oxidációját mindkét enzim katalizálja, és tisztítás illetve elválasztási műveletek alkalmazása nélküli fermentlében kíséreljük meg az aktivitás meghatározását, akkor a két enzim együttes aktivitását fogjuk mérni. A lakkáz aktivitás meghatározásához a guaiakolt vagy a 2,6-dimetoxifenolt szoktak használni, a tirozináznál pedig tirozint. Érdekes, hogy bár az elektrondonor szubsztrátra nincs különösebb preferenciájuk, akceptornak kizárólag molekuláris oxigént hasznosítanak. Az oxigén redukciója közben H2O2 nem keletkezik.

Az enzim könnyen inhibeálható kisméretű anionokkal (azidok, cianidok, fluoridok…) melyek a T2 és T3 réz atomokhoz kötnek, így megakadályozzák a belső elektrontranszfert. Más anyagokkal is gátolhatók, melyek vagy az aminosav oldalláncokat módosítják, ezáltal szerkezet és funkcióváltozást idéznek elő, vagy kelát-komplexálják a réz atomokat, esetleg helyettesítik azokat, azonban a funkciót már nem képesek megtartani (Hg2+).

A lakkázok lúgos pH-n stabilabbak, mint savason, feltehetően mert ilyen körülmények között az autooxidáció mértéke nem jelentős(Polaina and MacCabe).

## Biológiai funkciók

A lakkázoknak különböző élettani funkciói ismertek. A növények életében szerepet játszanak a sérülések gyógyításában, a termőszervek fejlődésében, növényi sejtfal regenerációjában és a termőföld anyagainak átalakításában. A gombák életében is kiemelt jelentősséggel bírnak: a lakkázok részt vesznek a patogenezis lejátszódásában, a spórapigmentációban és a morfogenezisben is.

A lakkázok egyik legtöbbet kutatott biológiai funkciója a növényi sejtfal lignifikációjával és a fehérrothadás közben zajló lignin depolimerizációval kapcsolatos. A lignin a növényi sejtfal egy szerkezeti összetevője. Heterogén és komplex polifenolos biopolimer, amely fenil-propanoid egységekből áll. A fakorhasztó *Basidiomycota* gombák, mint lakkáztermelők, nagyszámú előfordulása a természetben arra enged következtetni, hogy a gombaeredetű lakkázok fő funkciója a lignin depolimerizációja. Azonban ez a funkció ellentétben áll a növényeknél mutatottal, ahol is a lakkázok elsősorban ligninszintetizáló rendszer részeiként ismeretesek.

A lignin teljes biodegradációs folyamata során számos enzim (lakkázok, lignin peroxidázok, stb) szinergikus, ill. nem enzimatikus komponensek (pl. mediátorok) hatása érvényesül egyszerre, melyek egymással kölcsönhatva törekednek a lignin polimerizáció és depolimerizáció közötti egyensúly fenntartására. A kutatások eredményei arra utalnak, hogy a ligninen ható lakkáz enzim mindkétféle aktivitás mutatja. Mára az is világos, hogy a lignin bontási folyamatában nagyon reaktív (és így erősen mérgező) anyagok keletkeznek, melyek a gomba saját micéliumaiban is kárt tehetnek. Lehetséges, hogy a lakkázok egyik funkciója ezeknek a veszélyes anyagoknak az eltávolítása a ligninpolimerizációs aktivitás révén, mielőtt azok a hifafonalakhoz juthatnának. Jelenleg azonban a kezünkben lévő információ nem elegendő ahhoz, hogy egyértelmű következtetéseket lehessen levonni a lakkáz enzim lignifikációs/delignifikációs folyamatokban betöltött szerepéről.

## Ipari alkalmazások

A lakkázokat egyre elterjedtebben használják az iparban sokféle oxidatív folyamathoz, pl. a delignifikációban, a festék vagy a folt fehérítésében, a bioremediációban, a növényi rost módosításánál, az etanol előállításban, a bioszenzoroknál stb. Az ipari felhasználáshoz az enzim túltermelése szükséges, általában egy másik fajból származó gazdaszervezetben, amely nélkülözhetetlen előfeltétele termelésnek. A legtöbb kereskedelmi forgalomba kerülő lakkázt *Aspergillus* gazdaszervezetekben állítják elő. Génmérnökség segítségével már *S. cerevisiae*-be is sikerült lakkáz-géneket juttatni, valamint az ilyen enzimtermelési folyamatot gazdaságosabbá tenni.3

### Lakkáz-mediátor rendszer (LMS)

Az elmúlt 10 évben a lakkázok sokoldalúsága még jobban bővült a lakkáz-mediátor rendszer (LMS) feltalálásával. Az enzim kombinációja alacsony molekulatömegű vegyületekkel, pl. 2,2-azino-bisz-(3-etil-benztiazolin-6-szulfonát)-tal (ABTS) vagy az 1-hidroxi-benzotriazollal (HBT) nemcsak az ismert szubsztrátok átalakulásának magasabb arányát, de új reakciókat is eredményezett, amelyeknél a lakkáznak önmagában nem, vagy csak elhanyagolhatóan kis aktivitása volt.

 A mediátorvegyületek könnyen oxidálódnak a T1 helyen, olykor nagyon instabil és reaktív kationos gyököket eredményezve, amelyek viszont bonyolultabb szubsztrátokat oxidálhatnak. Ilyenkor a mediátor ún. *diffúziós elektronhordozó*ként működik4 lehetővé téve a nagyobb molekulatömegű szubsztrátok, pl. a lignin oxidálódását. A lakkáz-molekula által felvett elektronok végül az oxigénre kerülnek, így víz képződik (a T2 / T3 trinukleáris klaszternél). A mediátorok hatása két szempontból is előnyös a lakkázok számára:

* polimerek oxidációjakor fellépő sztérikus akadályok mediátorok segítségével kiküszöbölhetőek (az enzimnek és a polimernek nem kell kölcsönhatásba lépni közvetlen módon)
* megnövekedett szubsztráttartomány: képesek oxidálni olyan vegyületeket is, amelyeknek a redoxpotenciálja meghaladja a sajátjukat (a mediátornak a szubsztráténál magasabb redoxpotenciálja révén; azt is érdemes kiemelni, hogy a mediátorok keverékeinek szinergetikus hatásai javíthatják a lakkázok általi oxidációt5)

A kémiai mediátorok azonban általában mérgezőek, instabilok vagy drágák. Ezenkívül melléktermékekhez vezetnek és inaktiválják az enzimet: a mediátor oxidációjával a lakkáz erősen oxidáló hatású köztiterméket hoz létre a „köztes-mediátor” formájában, amely diffúziós elektronhordozóként való működése mellett kölcsönhatásba lép a lakkázzal is inaktiválva azt. A kutatók jelenleg is több új megközelítésből igyekeznek leküzdeni ezt az akadályt: természetes mediátorok (pl. tirozin4,6) keresésétől a lakkázok irányított termeltetéséig3

**Lakkáz-mediátor rendszer a cellulóz- és papíriparban**

A lignin eltávolítása a fás szövetekből egy elég nagy népszerűségnek örvendő kutatási terület, különösen a papír- és cellulózipari jelentősége miatt. A papírgyártáshoz használt cellulóz fehérítését sok esetben káros és szennyező vegyszerekkel végzik. A hagyományos módszereknél klór alapú szereket alkalmaznak, sokszor klórgázt, ami mérgező szennyezőanyag kibocsátáshoz vezethet. Először Bourbonnais and Paice (1990) mutatta ki, hogy a T. versicolorból származó lakkáz hatékonyan demetilezte a papírpépet és lebontotta a benne található lignint. Azóta több tanulmányban is elemezték az eljárás faktorait1. A lakkázok alkalmazása a cellulóz fehérítésében magasabb papírhozamot és energia megtakarítást eredményezhet.

**Lakkáz-mediátor rendszer és a policiklusos aromás szénhidrogének**

A policiklusos aromás szénhidrogének (PHA-k) a rendkívül veszélyes xenobiotikumok (mutagének, karcinogének) osztályába sorolhatók, szárazföldi és vízi környezetben is széles körben elterjedtek. A lakkázok képesek oxidálni a PHA-kat ártalmatlanabb, kevésbé mérgező vegyületekké. Hogy ez a biotranszformáció végbemehessen, szükség van redoxi mediátorok (HBT, ABTS)2 jelenlétére. A fehérpenészes rothadás által kiválsztott természetes mediátorok (mint a tirozin, 4-hidroxi-benzoesav, hidroxi-benzil-alkohol) szintén hasznosnak bizonyultak a PHA-k kinonokká oxidálásában3. Beszámoltak továbbá arról is, hogy a PHA-k és metabolitjaik biodegradációja az oxidációs állapotukkal fokozódik. Ebből arra következtethetünk, hogy az enzimes oxidáció és a mikroorganizmusok által kifejtett hatás együttesen hatékony kármentesítő stratégia lehet PHA-k esetén. Emellett a kinonok jelentősen kevésbé mutagének és karcinogének mint a megfelelő PHA-k4.

**Etanol előállítás**

A lignocellulózok híg savas hidrolízise olyan cukorkeverékeket eredményez, melyek élesztővel üzemanyag-alkohollá erjeszthetőek. A fenolvegyületek jelenléte a hidrolizátumban gátolja az erjedést. A lakkáz heterológ expresszója T. versicolor-ból S. cerevisiae-be a fermentáció alatt javítani látszik az üzemanyag etanol előállítását ezen vegyületek kiküszöbölésével5.

**Kozmetikumok**

 Hajfestés és/vagy szőkítés során általában olyan erélyes szereket használnak, melyek károsíthatják a haj szerkezetét. Ha kémiai anyagok helyett lakkázt használunk, a festék prekurzorok hatásos színező anyaggá oxidálhatók. Szintén használtak lakkázokat hidroxisztilbének jelenétében hajfehérítőként6. Kozmetikai alkalmazásban használt pigmentek, valamint melaninok is előállíthatóak lakkázok katalizálta oxidatív reakciókkal. A lakkáz bőrön való alkalmazása során hasznosnak bizonyulhat a melanin eredetű foltok eltűntetésében is7.

**Élelmiszeripar**

A lakkázok felhasználhatóak italok (bor, gyümölcslevek, sör) előállításához, aszkorbinsav meghatározáshoz, cukorrépa pektintartalmának gélesítéséhez, sütéshez, bioszenzorként az élelmiszerek érzékszervi tulajdonságainak javításához8.

A bor stabilizálása az egyik legfőbb élelmiszeripari alkalmazása a lakkáznak. A lakkáz szelektíven a polifenolokat célozza meg a készítés folyamán. A mustban történő alkalmazása jó ízű, stabil bort eredményez. A lakkázok élelmiszer adalékanyagként történő alkalmazása nem engedélyezet, így immobilizált formában használják a borkészítés közben, hogy elválasztható legyen a terméktől és újra fel lehessen használni9.

A hosszútávon tárolt sörök esetében visszatérő probléma, hogy só válik ki, ennek kiküszöbölésére a cefréhez, vagy az előállítás végén a termékhez lakkázt adagolnak. Az oxigén jelenléte nemkívánatos a kész sörben, a hozzáadott lakkáz viszont eltávolítja az összes felesleges oxigént, ezzel növelve a sör tárolási idejét. Emellett szintén eltávolítja a sörben maradt polifenolokat.

Az alma és szőlőlé esetében a fenolok túlzott oxidációja rontja a termék érzékszervi minőségét. Több enzimes kezelést is javasolnak a gyümölcslé stabilizálására, köztük a lakkáz enzim használatát is10.

1 Call and Call, 2005; Sigoillot et al., 2005; Bajpai, 2004; Call and Mucke, 1997

2 Alcalde et al., 2002; Majcherczyk and Johannes, 2000; Majcherczyk et al., 1998; Collins et al., 1996; Johannes et al., 1996

3Johannes and Majcherczyk, 2000)

4Torres et al., 2003

5Larsson et al., 2001

6Onuki et al., 2000; Pruche et al., 2000

7Tetsch et al., 2005; Nagai et al., 2003

8Minussi et al., 2002

9Servili et al., 2000

10Minussi et al., 2002)

### A szerves oldószerek jelentősége

A különböző enzimes reakciók lejátszódása során elengedhetetlen, hogy az enzim és a szubsztrátmolekula között megfelelő kötődés alakuljon ki. Lakkázok esetében ez a feltétel vizes közegben általában nem valósul meg, mivel a szubsztrátok jelentős része, mint például a lignin, számos szteroid és a policiklusos aromás szénhidrogének (PAH), erősen hidrofób tulajdonságúak. Megoldást jelenthet, ha a reakció körülményeit megváltoztatva víz helyett szerves oldószereket alkalmazunk,[[1]](#endnote-1) ennek hatására azonban a lakkázok meglehetősen instabillá válnak.[[2]](#endnote-2) A stabilitás és hatékonyság megőrzése történhet immobilizációval[[3]](#endnote-3), illetve molekuláris biológiai módszerek segítségével[[4]](#endnote-4). *Alcalde és társai* kísérletében acetonitril és etanol jelenlétében Myceliophthora thermophila lakkázt expresszáltak élesztőgombákban in vitro. A kutatás bizonyította, hogy mutációt szenvedett enzimek ellenállóbbá váltak és kevésbé váltak instabillá magas szerves oldószer koncentráció esetén.

### Bioremediáció

A fenolok, triklórfenolok, organofoszfát tartalmú növényvédőszerek, illetve azofestékek toxicitásának csökkentésében kiemelkedő szerepe van a lakkázoknak, ezáltal segítik a bioremediációt. Az ipari szennyvízben és az egészségügyi hulladéklerakókban leggyakoribb szerves vegyi anyag a fenolok és származékaik (klórfenolok, dimetoxifenolok és nitrofenolok) lakkázzal oxidálhatók o-benzokinonok képződését eredményezve[[5]](#endnote-5), amelyek kevésbé mérgezőek, mint a fenolok. A foszfor-kén kötést tartalmazó szerves rovarítók ellenállóak az enzimes hidrolízissel szemben[[6]](#endnote-6), ezért csak kémiai mediátorok segítségével képesek oxidálni[[7]](#endnote-7).

### Elektrokémiai folyamatok

A lakkázok kivételes tulajdonsága, hogy nem csupán az enzimes, hanem az elektrokémiai reakciókat is képesek katalizálni[[8]](#endnote-8). Az oxigénmolekula elektroredukciója során az enzim T1 helye veszi fel az elektronokat közvetlenül az elektródtól hidrogénperoxid keletkezése nélkül. A reakció leghatékonyabb szervetlen katalizátora a speciálisan kezelt platina, melynek egyensúlyi oxigénpotenciálja 1,23 V. Azonban immobilizált lakkázokkal borított elektródákat alkalmazva az potenciál értéke 0,6-1,2 V között változhat a rögzített enzim mennyiségétől függően. Ezen elv alapján számos potenciometrikus bioszenzort[[9]](#endnote-9) fejlesztettek ki, illetve bioüzemanyag-cellák[[10]](#endnote-10) tervezése során is jelentős az alkalmazása. Chen és társai olyan miniatűr bioüzemanyag-cellát terveztek, amely két 7 μm átmérőjű, 2 cm hosszú szénszálas elektródból készül, az anódhoz glükózoxidázt kapcsolnak, míg a katód felületére lakkázt rögzítenek.[[11]](#endnote-11)

### Farostlemez-előállítás

A lakkázokat a lignin alapú anyagok enzimes térhálósításánál használják közepes sűrűségű farostlemezek előállításához, amelyeket manapság bútorok gyártása során használnak. Korábban erre a célra káros és szennyező vegyületekkel, például formaldehiddel használtak.[[12]](#endnote-12)

## Irodalomjegyzék

1. Mehra, Rukmankesh, et al. “A Structural-Chemical Explanation of Fungal Laccase Activity.” *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, Springer US, 2018, pp. 1–16, doi:10.1038/s41598-018-35633-8.

Polaina, Julio, and Andrew P. MacCabe. “Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications.” *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, 2007, doi:10.1007/1-4020-5377-0.

3. Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C. and Arnold, F.H. (2003a) *Functional expression of a fungal laccase in Saccharomyces cerevisiae by directed evolution*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 987–995

4. Majcherczyk, A. and Johannes, C. (2000) *Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase*. Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj. 1474, 157–162

5. Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R. and Vazquez-Duhalt, R. (1999) *Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3805–3809

6. Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M.J. and Martinez, A.T. (2005) *Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes.* Appl. Environ. Microbiol. 71, 1775–1784

7. Torres, E., Bustos-Jaimes, I. and Le Borgne, S. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. Appl. Catal. B-Environ. 46, 1–15

8. Rodakiewicz-Nowak, J., Kasture, S.M., Dudek, B. and Haber, J. (2000) Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. J. Mol. Catal. B-Enzymatic 11, 1–11

9. Duran,N.,Rosa,M.A.,D’Annibale,A.andGianfreda,L.(2002)Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme Microb. Technol. 31, 907–931

10. Alcalde, M., Bulter, T., Zumárraga, M., García-Arellano, H., Mencía, M., Plou, F.J. and Ballesteros, A. (2005) Screening mutant libraries of fungal laccases in the presence of organic solvents. J. Biomol. Screening. 10, 624–631.

11. Ullah, M.A., Bedford, C.T. and Evans, C.S. (2000) Reactions of pentachlorophenol with laccase from Coriolus versicolor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 230–234

12. Jauregui, J., Valderrama, B., Albores, A. and Vazquez-Duhalt, R. (2003) Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. Biodegradation 14, 397–406

13. Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H., Chefetz, B., LeibovitzPersky, L., Friesem, D. and Hadar, Y. (1998) Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. Febs Letters 438, 195–200

14. Call, H.P. and Mucke, I. (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym(R)-process). J. Biotechnol. 53, 163–202

15. Freire, R.S., Duran, N. and Kubota, L.T. (2002) Development of a laccase-based flow injection electrochemical biosensor for the determination of phenolic compounds and its application for monitoring remediation of Kraft E1 paper mill effluent. Anal. Chim. Acta 463, 229–238

16. Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A.I., Whittaker, J.W. and Gorton, L. (2005) Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. Biosen. Bioelectron. 20, 2517–2554

17. Chen, T, Barton SC., Binyamin G, Gao Z, Zhang Y, Kim HH and Heller A (2001) A miniature biofuel cell. J. Am. Chem. Soc. 123, 8630–8631

18. Widsten, P., Tuominen, S., Qvintus-Leino, P. and Laine, J.E. (2004) The influence of high defibration temperature on the properties of medium-density fiberboard (MDF) made from laccase-treated softwood fibers. Wood Sci. Technol. 38, 521–528

1. Torres et al., 2003; Gianfreda et al., 1999; Yaropolov et al., 1994 [↑](#endnote-ref-1)
2. Rodakiewicz-Nowak et al., 2000; Luterek et al., 1998 [↑](#endnote-ref-2)
3. Duran et al., 2002 [↑](#endnote-ref-3)
4. Alcalde et al., 2005 [↑](#endnote-ref-4)
5. Ullah et al., 2000 [↑](#endnote-ref-5)
6. Jauregui et al., 2003 [↑](#endnote-ref-6)
7. Amitai et al., 1998 [↑](#endnote-ref-7)
8. Call and Mucke, 1997; Yaropolov et al., 1994 [↑](#endnote-ref-8)
9. Freire et al., 2003; Freire et al., 2002; Milligan and Ghindilis, 2002 [↑](#endnote-ref-9)
10. Shleev et al., 2005 [↑](#endnote-ref-10)
11. Chen et al., 2001 Torres [↑](#endnote-ref-11)
12. Widsten et al., 2004; Felby et al., 2002 [↑](#endnote-ref-12)