

**Министерство образования и науки Российской Федерации**  
**Федеральное Государственное Автономное Образовательное учреждение**  
**высшего профессионального образования**  
**«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
**ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ**

**КАФЕДРА БОТАНИКИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Направление: 020400.62 – Биология

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

**Лакказы лишайника *Cladonia mitis*: биохимические свойства,  
изоформентный состав, медиаторы**

**Работа завершена:**

Студент 4 курса

Группа 01-204

«7» июня 2016 г. \_\_\_\_\_ (Д.А. Ломаева)

**Работа допущена к защите:**

Научный руководитель

доктор биологических наук, зав. лабораторией

«7» июня 2016 г. \_\_\_\_\_ (Ф.В. Минибаева)

Зав. кафедрой

доктор биологических наук, профессор

«7» июня 2016 г. \_\_\_\_\_ (О.А. Тимофеева)

Казань – 2016 г.

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	8
1.1 Лакказы: общая характеристика фермента .....	8
1.1.1 Источники лакказ .....	12
1.2 Химизм реакций: субстраты и медиаторы лакказ .....	14
1.2.1 Субстраты лакказ .....	14
1.2.2 Механизм окисления.....	17
1.2.3 Лакказные медиаторы.....	18
1.3 Биотехнологическое применение лакказ .....	22
1.4 Лишайники как модель для изучения активности лакказ.....	26
1.4.1 Стрессовая устойчивость лишайников .....	27
1.4.2 Редокс-ферменты лишайников .....	30
1.4.3 Лишайниковые вещества.....	32
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	33
<b>2 Материалы и методы исследований</b> .....	33
2.1 Объект исследования .....	33
2.2 Методы исследования.....	33
2.2.1 Регидратирование лишайника .....	33
2.2.2 Подготовка образца.....	33
2.2.3 Диализ.....	33
2.2.4 Подготовка образца лишайника для измерения лакказной активности. ....	35
2.2.5 Определение активности лакказы .....	35
2.2.6 Подготовка белков лишайника для очистки и электрофореза путем последовательного осаждения с помощью $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	35
2.2.7 Проведение ионообменной хроматографии.....	36
2.2.8 Разделение белков с помощью нативного гельэлектрофореза.....	37
2.2.9 Разделение белков с помощью изоэлектрофокусирования .....	37

2.2.10 Изучение биологической активности лишайниковых веществ .....	37
2.2.10.1 Выделение лишайниковых веществ .....	37
2.2.10.2 Культивирование бактерий .....	37
2.2.10.3 Определение численности жизнеспособных клеток .....	37
2.2.10.4 Определение токсичности .....	38
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	<b>39</b>
3.1 Изменение активности лакказы в зависимости от времени регидратации лишайника .....	39
3.2 Влияние ингибиторов на лакказную активность .....	40
3.3 Влияние медиаторов на активность лакказы .....	43
3.4 Изучение ферментативной кинетики фермента - константа Михаэлиса–Ментен .....	46
3.5 Анализ изоферментного состава лакказ <i>C. mitis</i> .....	48
3.6 Биологическая активность лишайниковых веществ .....	52
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	<b>55</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b> .....	<b>57</b>

## Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

ГПВ – гуминоподобные вещества

ГБТ – 1-гидроксibenзотриазол

НО – гидроксильный радикал

ДДК – диэтилдитиокарбамат натрия

КОЕ – колониеобразующая единица

ЛМС – лакказа-медиаторные системы

ЛМФ – лигнин модифицирующие ферменты

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

$\text{H}_2\text{O}_2$  – перекись водорода

$\text{O}_2^-$  – супероксидный анион радикал

$^1\text{O}_2$  – синглетный кислород

ФК – феруловая кислота

ABTS – диаммониевая соль 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоной) кислоты

## ВВЕДЕНИЕ

Лакказа – медьсодержащий фермент, катализирующий окисление широкого спектра субстратов кислородом, восстанавливая его до воды [Лисова, 2011]. Лакказа представляет большой интерес с точки зрения фундаментальных исследований его структуры и механизма катализа. Это обусловлено строением активного центра лакказ. Большой интерес, как в фундаментальном, так и прикладном плане, представляет субстратная специфичность лакказ, способных окислять широкий круг органических, в первую очередь фенольных, и неорганических соединений.

Лакказа обнаружена у бактерий, грибов, растений и насекомых. Этот фермент участвует в процессах синтеза меланинов, пигментов, развитии спор, детоксикации опасных метаболитов, деградации лигнина. Лакказа – важнейший компонент лигнолитического комплекса дереворазрушающих грибов белой гнили, осуществляющих разложение одного из наиболее распространенных природных полимеров – лигнина, однако роль лакказы в этих процессах до конца не изучена [Шлеев, 2003; Фурсова, 2007; Шевченко, 2013]. Недавно была доказана еще одна функция лакказ – участие в образовании гуминоподобных веществ [Шлеев, 2003; Шевченко, 2013].

Интерес к практическому использованию лакказ возрос в середине 90-х годов XX века после открытия медиаторов, соединений, способных усиливать действие ферментов. Данное открытие позволило существенно расширить область их практического применения. Медиаторы лакказ представляют собой субстраты этих ферментов, в процессе окисления которых образуются химически активные продукты. Последние могут вступать в реакцию с соединениями, которые не подвергаются окислению одними только лакказами. Кроме того, в процессе окисления органических субстратов образуются свободные радикалы, которые могут модифицировать другие соединения. Это позволяет существенно расширить область использования лакказ [Шлеев, 2003].

В настоящее время лакказы применяются в различных сферах биотехнологии. Основной сферой применения данного фермента является биodeградация лигнина и лигниноподобных соединений, а также веществ, имеющих структуру, сходную со структурой мономеров лигнина, таких как полициклические ароматические углеводы. Существует несколько направлений практического использования ферментов, разлагающих лигнин, в том числе изготовление биопластиков, отбелка бумаги. На определенной стадии биodeградации лигнина древесина приобретает пластичность, что позволяет изготавливать на ее основе экологически безопасные древесные пластики, древесноволокнистые плиты, блоки, картон без применения токсических связующих соединений. Активно ведутся исследования по применению лакказ для отбеливания целлюлозы. При этом преимущество использования лакказ, в отличие от других лигнолитических ферментов, заключается в том, что использование системы окисления на основе лакказы и низкомолекулярных медиаторов позволяет избавиться от участия перекиси водорода в процессе биоотбеливания [Фурсова 2007; Беловежец 2010].

Используемые для биотехнологических целей лакказы низших грибов обладают рядом физико-химических особенностей, ограничивающих их применение, например, невысокая термостабильность и узкий рН оптимум реакции. В связи с этим, поиск новых ферментов по-прежнему актуален, причем особенно востребованы ферменты с высоким редокс-потенциалом, термостабильные и активные в области рН, близкой к нейтральной. При этом, как правило, поиск ориентирован на доминирующие формы в семействах множественных изоформ лакказ, так что минорные формы или трудноразделяемые формы лакказ остаются неизученными.

Перспективными объектами для изучения лакказ являются лишенизированные грибы. Лишайники характеризуются высокой устойчивостью к абиотическим стрессорам, таким как засуха, экстремальные температуры, ультрафиолетовые излучения, и поэтому они могут расти в условиях, которые могут уничтожить другие организмы [Beckett *et al.*, 2008].

Кроме этого, вторичные метаболиты лишайников – лишайниковые вещества – являются субстратами лакказ и обладают биологической активностью. Несмотря на интенсивное изучение лакказ в грибах, лакказы в лишайниках изучены крайне недостаточно.

В связи с вышеизложенным, целью нашей работы явилось изучение лакказной активности в лишайнике *Cladonia mitis*.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Определить кинетические характеристики лакказной активности в талломе лишайника *C. mitis* с использованием различных субстратов.
2. Изучить влияние ингибиторов и медиаторов на активность лакказы.
3. Произвести разделение и очистку изоформ лакказ методом ионообменной хроматографии.
4. Изучить изоферментный состава лакказ с помощью нативного щелочного гельэлектрофореза и изоэлектрофокусирования.
5. Изучить бактериостатические эффекты лишайниковых веществ, экстрагированных из *C. mitis*.

## ВЫВОДЫ

1. Определены кинетические характеристики лакказной активности в талломе лишайника *C. mitis* с использованием различных субстратов. Сравнение каталитических параметров константы Михаэлиса-Ментен и максимальной скорости окисления ABTS, *o*-дианизидина и 2,6-DMP выявило, что лакказа лишайника *C. mitis* характеризуется наибольшей чувствительностью к *o*-дианизидину и обладает высокой скоростью его окисления. Величина  $V_{\max}/K_m$  для *o*-дианизидина выше, по сравнению с 2,6-DMP и ABTS, что говорит об эффективности катализа лакказы при окислении *o*-дианизидина.
2. Обнаружен эффект подавления активности лакказы в талломе лишайника *C. mitis* при действии ингибиторов медь-содержащих ферментов диэтилдитиокарбамата натрия и азиды натрия. С использованием двух-субстратных систем показано повышение активности ABTS-зависимой лакказы при добавлении феруловой кислоты и ферулат-зависимой лакказы при добавлении 2,6-DMP, что говорит о том, что феруловая кислота и 2,6-DMP обладают медиаторными свойствами. Данные об эффектах ингибиторов и медиаторов свидетельствуют о сложности регуляции активности лакказ лишайника *C. mitis*.
3. Проведено разделение и частичная очистка изоформ лакказ методом ионообменной хроматографии. Анализ активности очищенных белков показал наличие одного пика лакказной активности, элюированного при 0,25 – 0,3 М NaCl.
4. Изучен изоферментный состав лакказ с помощью нативного щелочного гельэлектрофореза и изоэлектрофокусирования. В талломе лишайника лишайника *C. mitis* выявлено наличие нескольких изоформ лакказ и доминирующей щелочной изоформы с *pI* 8.6 и молекулярной массой 480 кДа.



5. Выявлен бактериостатический эффект лишайниковых веществ, экстрагированных из *C. mitis*. Наибольшая активность лишайниковых веществ наблюдалась по отношению к спорным бактериям, которые являются природными антагонистами фитопатогенных грибов. Лишайники представляют собой симбиотические ассоциации грибов и микроскопических зеленых водорослей, поэтому избирательное действие лишайниковых веществ направлено в первую очередь на подавление спорной микрофлоры.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. **Беловежец, Л.А.** Перспективные способы переработки вторичного лигоцеллюлозного сырья [Текст] / Л.А. Беловежец, И.В. Волчатова, С.А. Медведева // Химия растительного сырья. – 2010. – №2. – С. 5–16.
2. **Белова, Н.В.** Термостабильная лакказа iii гриба *Steccherinum ochraceum* Le (BIN) 1833 D и способ получения лакказ / Н.В. Белова, Л.А. Головлева, М.П. Коломыцева, Н.М. Мясоедова, Н.В. Псурцева, А.М.Черных // Библиотека патентов на изобретения [Электронный ресурс]. – 2010. – Режим доступа : <http://www.freepatent.ru/patents/2385930> – Дата доступа : 18.02.2016.
3. **Голенкина, С.А.** Создание систем эффективной экспрессии лакказы *Trametes hirsuta* в дрожжах *Pichia pastoris* [Текст] / С.А. Голенкина, О.В. Королева // Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины: материалы школы-конференции молодых ученых, Москва, 16-17 сентября 2010 г. – С. 22-24.
4. **Гордон, Л.Х.** Образование супероксида редокс-системой плазмалеммы корневых клеток и ее участие в детоксикации ксенобиотиков [Текст] / Л.Х. Гордон, О.П. Колесников, Ф.В. Минибаева // Доклады РАН.– 1999. – Т. 367. –С. 409–411.
5. **Горшина, Е.С.** Способ получения технического препарата лакказы / Е.С. Горшина, Т.В. Русинова, Н.С. Марьина, А.И. Ярополов, О.В. Морозова, И.Н. Щелбыкин // Библиотека патентов на изобретения [Электронный ресурс]. – 2009. – Режим доступа: <http://www.freepatent.ru/patents/2345134> – Дата доступа: 18.02.2016.
6. **Королева, О.В.** Иммуноферментный анализ разложения гербицида почвенными и дереворазрушаемыми грибами [Текст] / О.В. Королёва, Е.В. Степанов, Е.О. Линдесман, Л.Г. Васильченко, В.В. Хромоныгина, А.В. Жердев, М.Л. Рябинович // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – №4. – С. 413–418.

7. **Королева, О.В.** Лакказы базидиомицетов: свойства, структура, механизм действия и практическое применение [Текст]: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / О.В. Королева – Моск. гос. ун-т. – Москва, 2006. – 50 с.
8. **Лисова, З.А.** Свойства лакказ *Cerrena unicolor* ВКМ F-3196 [Текст] / З.А. Лисова, А.А. Леонтьевский // Сб. тезисов 13-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука 21 века», Пущино, 28 сентября – 2 октября 2011 г. – С. 73–74.
9. **Лященко, А.В.** Пространственная структура медных полиядерных оксидаз - лакказ *Coriolus zonatus* и *Cerrena maxima* [Текст]: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / А.В. Лященко; Моск. гос. ун-т. – Москва, 2006. – 22 с.
10. **Мерзляк, М.Н.** Активированный кислород и жизнедеятельность растений [Текст] / М.Н. Мерзляк // Сорос. образ. журнал.–1999. –Т. 9. – С. 20–26.
11. **Морозова, О.В.** Лакказы базидиальных грибов, лакказа-медиаторные системы и возможности их использования [Текст]: автореф. дис. ... к-та хим. наук / О.В. Морозова – Моск. гос. ун-т. – Москва, 2006. – 50с.
12. **Минибаева, Ф.В.** Активные формы кислорода и ионная проницаемость плазмалеммы в растительных клетках при стрессе [Текст]: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Ф.В. Минибаева – Санкт-Петербургский гос. ун-т. – Санкт-Петербург, 2005. – 42 с.
13. **Полторак, О. М.** Физико-химические основы ферментативного катализа [Текст] / О. М. Полторак, Е.С. Чухрай. – М. Высшая школа, 1970. —360 с. – ISBN отсутствует.
14. **Цыперович, А.С.** Ферменты [Текст] / А.С. Цыперович; Основы химии и технологии. – Киев: Техніка, 1971. –354 с. – ISBN отсутствует.
15. **Черкашин, Е.А.** Структурно-генетическая организация лакказ базидиальных грибов [Текст]: автореф. дис. ... к-та хим. наук / Е. А. Черкашин; МГУ, – М.: Изд. Унив., 2009. – 23 с.

16. **Скулачев, В.П.** Кислород в живой клетке: добро и зло [Текст] / В.П. Скулачев // Сорос. образ. журнал. – 1996. – Т. 3. – С. 10.
17. **Фурсова, В.П.** Математическая модель функционирования лакказы внеклеточного лигнолитического комплекса гриба *Panus tigrinus*. рН зависимость работы фермента [Текст] / В.П. Фурсова, О.С. Надежина А.И. Лаврова, Д.А. Кадималев, Г.Ю. Ризниченко // Математика. Компьютер. Образование. МКО-2007, Т.2:XIV Международная конференция, 2007г. – Пущино, 2007. – С. 327–334.
18. **Шевченко, Е.А.** Разработка метода скрининга базидиомицетов, перспективных продуцентов лакказы [Текст] / Е.А. Шевченко, Е.А. Бессолицына, И.В. Драмов // Прикладная биохимия и микробиология – 2013. – №3. – С. 285–287.
19. **Шлеев, С.В.** Спектральное и электрохимическое изучение лаказ базидиальных грибов [Текст] / С.В. Шлеев, Е.А. Зайцева, Е.С. Горошина и др. // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2003. – Т. 44, №1. – С. 35–39.
20. **Явметдинов, И.С.** Лакказа и Mn-пероксидаза базидиомицета *Cerrena maxima*: характеристика и роль в биосинтезе гуминоподобных веществ [Текст]: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / И.С. Явметдинов – Моск. гос. ун-т. – Москва, 2003. – 25 с.
21. **Agematu, H.** Oxidative decarboxylation of 4-hydroxymandelic acid and 2-(4-hydroxyphenyl) glycine by laccase from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria* [Text] / H. Agematu, N. Shibamoto, H. Nishida, R. Okamoto, T. Shin, S. Muraio // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1993. – V.57. – P. 1877–1881.
22. **Ahmad, D.** Isolation and characterization of symbiotic N<sub>2</sub>-fixing *Rhizobium meliloti* from soils contaminated with aromatic and chloroaromatic hydrocarbons: PAHs and PCBs [Text] / D. Ahmad, R. Mehmannaavaz, M. Damaj // Int. Biodeter. Biodegr. – 1997. – V.3. – P. 33–39.

23. **Alexandre, G.** Laccases are widespread in bacteria [Text] / G. Alexandre, I.B. Zhulin // Trends Biotechnol. – 2000. – V.18. – P. 41–42.
24. **Aramayo, R.** Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* yA (laccase 1) gene [Text] / R. Aramayo, W.E. Timberlake // Nucleic Acids Res. – 1990. – V.18. – P. 3415–3415.
25. **Baldrian, P.** Fungal laccases – occurrence and properties [Text] / P. Baldrian // FEMS Microbiol. – 2006. – V.30. – P. 215–242.
26. **Beckett, R.P.** Stress physiology and the symbiosis [Text] / R.P. Beckett, I. Kranner, F.V. Minibayeva // In: Nash TH (ed.), Lichen Biology, 2<sup>nd</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge. – 2008. – P. 134–151.
27. **Beckett R.P.** Extracellular Rapid breakdown of exogenous extracellular hydrogen peroxide by lichens [Text] / R.P. Beckett, F.V. Minibayeva // Physiol. Plantarum. – 2007. – V.588. – P. 596.
28. **Beckett, R.P.** Extracellular reactive oxygen species production by lichens [Text] / R.P. Beckett, F.V. Minibayeva, Z. Laufer // Lichenologist. – 2005. – V. 37. – P. 397–407.
29. **Beckett, R.P.** Oxidoreductases and cellulases in lichens: Possible roles in lichen biology and soil organic matter turnover [Text] / R.P. Beckett, A.G. Zavarzina, C. Liers // Fungal Biology. – 2013. – V.117. – P. 431–438.
30. **Behera, B.C.** Optimization of culture conditions for lichen *Usnea ghattensis* G. awasthi to increase biomass and antioxidant metabolite production [Text] / B.C. Behera, N. Verma, A. Sonone, U. Makhija // Food Technology and Biotechnology. – 2007. – V.47. – P. 7–12.
31. **Belnap, J.** Biological Soil Crust: Structure, Function, and Management: Ecological Studies [Text] / J. Belnap, O.L. Lange // Berlin: Springer. – 2003. – V.4. – P. 150.
32. **Bertrand, G.** Sur la prusence simultanue de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons [Text] / C. R. Hebd // Seances Acad. Sci. – 1896. – V.123. – P. 463–465.

33. **Bezivin, C.** Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines [Text] / C. Bezivin, S. Tomasi, F. Lohezic-Le Devehat, C. Boustie // *Phytomedicine*. – 2003. – V.10. – P. 499–503.
34. **Bollag, J.M.** Comparative studies of extracellular fungal laccase [Text] / J.M. Bollag, A. Leonowicz // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1984. – V.48. – P. 849–854.
35. **Bown, D.** Encyclopedia of herbs and their uses [Text] / D. Bown // London: Dorling. – 2001. – London. – p.390.
36. **Bourbonnais, R** Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role of laccase in lignin biodegradation [Text] / R. Bourbonnais, M.G. Paice // *FEBS Lett.* – 1990. – V. 267. – P. 99–102.
37. **Brouwers, G.J.** Cum A, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn<sup>2+</sup> oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1 [Text] / G.J. Brouwers, J.P.M. de Vrind, P.L. Corstjens, P. Cornelis, C. Baysse, E.W.D.V. de Jong // *Appl. Environ. Microb.* – 1999. – V.65. – P. 1762–1768.
38. **Bucar, F.** Antiproliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets [Text] / F. Bucar, I. Schneider, H. Ogmundsdottir, K. Ingolfssdottir // *Phytomedicine*. – 2004. – V.11. – P. 602–606.
39. **Burlando, B.** Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds [Text] / B. Burlando, E. Ranzato, A. Volante, G. Appendino, F. Pollastro, L. Verotta // *Planta Medica*. – 2009. – V.75. – P. 607–613.
40. **Butt, V.S.** Direct oxidases and related enzymes [Text] / V.S. Butt // In: Davies DD (ed.) *The biochemistry of plants*. – 1980. – V.2. – P.81–123.
41. **Call, H.P.** History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems [Text] / H.P. Call, I. Mucke // *J. Biotechnol.* – 1997. – V.53. – P. 163–202.
42. **Camarero, S.** Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes [Text] / S. Camarero, D.

- Ibarra, M.J. Martinez, A.T. Martinez // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – P. 1775–1784.
43. **Canas, A.I.** Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes [Text] / A.I. Canas, C. Susana // *Biotechnology Advances.* – 2010. – V.28. – P. 694–705.
44. **Cantarella, G.** Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems: Catalytic or stoichiometric procedures [Text] / G. Cantarella, C. Galli, P. Gentili // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* – 2003. – V.22. – P. 135–144.
45. **Cai, X.** Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis* [Text] / X. Cai, E.J. Davis, J. Ballif, M. Liang, E. Bushman, V. Haroldsen, J. Torabinejad, Y. Wu // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V.57. – P. 2563–2569.
46. **Claus, H.** Laccases and their occurrence in prokaryotes [Text] / H. Claus // *Arch. Microbiol.* – 2003. – V.179. – P. 145–150.
47. **Coxson, D.S.** Nadkarni N.M. Ecological roles of epiphytes in nutrient cycles of forest ecosystems [Text] / D.S. Coxson, N.M. Nadkarni // *In Forest Canopies*, ed. M.D. Lowman and N.M. Nadkarni. – 1995. – P. 495–543.
48. **Dean, J.F.D** Laccase and the deposition of lignin in vascular plants [Text] / J.F.D Dean, K.E.L. Eriksson // *Holzforschung.* – 1994. – V.48. – P. 21–33.
49. **De Silva, D.M.** The FET3 gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase [Text] / D.M. De Silva, C. C. Askwith, D. Eide, J. Kaplan // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V.270. – P. 1098–1101.
50. **Duran, N.** Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review [Text] / N. Duran, M.A. Rosa, A. D'Annibale, L. Gianfreda // *Enzyme Microb. Technol.* – 2002. – V.31. – P. 907–931.

51. **Elstner, E.F.** Mechanisms of oxygen activation during plant stress [Text] / E.F. Elstner, W. Oßwald // Proceeding of the Royal Society of Edinburgh. – 1994. – V.102. – P. 131–154.
52. **Endo, K.** A novel extracytoplasmatic phenol oxidase of *Streptomyces*: it's possible involvement in the onset of morphogenesis [Text] / K. Endo, K. Hosono, T. Beppu, K. Ueda // Microbiology. – 2002. – V.148. – P.1767–1776.
53. **Eggert, C** Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* [Text] / C. Eggert, P.R. LaFayette, U. Temp, K.E.L. Eriksson // FEBS Lett. – 1997. – V.407.–P. 89–92.
54. **Eggert, C.A** Fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. [Text] / C. Eggert, U. Temp, J.F.D. Dean, K.E.L. Eriksson // FEBS Lett. – 1996. – V.391. – P.144–148.
55. **Evans, R.D.** Microbiotic crust and ecosystem processes [Text] / R.D. Evans, J.R. Johansen // Critical Reviews in Plant Sciences. – 1999. – V.18. – P. 183–225.
56. **Fabbrini, M.** Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase [Text] / M. Fabbrini, C. Galli, P. Gentili // J. Mol. Catal. B: Enzym. – 2002. – V.16. – P. 231–240.
57. **Friedmann, E.I.** Endolithic microorganisms in the Antarctic cold desert [Text] / E.I. Friedmann // Science. – 1982. – V.215. – P. 1045–1053.
58. **Galante, Y.M.** Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries [Text] / Y.M. Galante, C. Formantici // Curr. Org. Chem. – 2003. – V.7. – P. 1399–1422.
59. **Giardina, P.** Laccases: anever-ending story [Text] / P. Giardina, V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, G. Sannia // Cell Mol. Life Sci. – 2009. –V. 67. – P. 369–385.
60. **Givaudan, A.** Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum* [Text] / A. Givaudan, A. Effosse, D. Faure, P. Potier,



- M.L. Bouillant, R. Bally // FEMS Microbiol. Lett. – 1993. – V.108. – P. 205–210.
61. **Gnanamani, A.** Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes [Text] / A. Gnanamani, M. Jayaprakashvel, M. Arulmani, S. Sadulla, // Enzyme Microb. Technol. – 2006. – V.38. – P. 1017–1021.
62. **Grass, G.** Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli* [Text] / G. Grass, C. Rensing // J Bacteriol. – 2001. – V.183. – P.2145–2147.
63. **Hakulinen, N.** Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site [Text] / N. Hakulinen, L. Kiiskinen, K. Kruus, M. Saloheimo, A. Paananen, A. Koivula, J. Rouvinen // Nat. Struct. Biol. – 2002. – V.9. – P. 601–605.
64. **Hale, M.E.** The Biology of Lichens [Text] / M.E. Hale // 2<sup>nd</sup> edn. – London: Edward Arnold. – 1974. – p.320.
65. **Hawksworth, D.L.** The Lichen-forming Fungi [Text] / D.L. Hawksworth, D.J. Hill // Glasgow: Blackie. – 1984. – V.10. – P. 799 – 807.
66. **Hullo, M.F.** Cot A of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase [Text] / M.F. Hullo, I. Moszer, A. Danchin, I. Martin-Verstraete // J. Bacteriol. – 2001. – V.183. – P. 5426–5430.
67. **Huneck, S.** Identification of lichen substances [Text] / S. Huneck, I. Yoshimura // Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. – 1996. – V.15. – P. 19 – 21.
68. **Kim, C** Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* yac K gene [Text] / C. Kim, W.W. Lorenz, J.T. Hoopes, J.F.D. Dean // J Bacteriol. – 2001. – V.183. – P. 4866–4875.
69. **Kindersley Johnson, C. J.** Degradation of the disease-associated prion protein by a serine protease from lichens [Text] / C.J. Kindersley Johnson, J.P. Bennett, S.M. Biro, J.C. Duque-Velasquez, C.M. Rodriguez, R.A. Bessen // PLoS One. – 2011. – V.6. – P. 19836–19836.

70. **Kirk, T.K.** Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin [Text] / T.K. Kirk, R.L. Farrell // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1987. – V.41. – P. 465–505.
71. **Kosanic, M.** Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of 3 *Umbilicaria species* [Text] / M. Kosanic, B. Rankovic, T. Stanojkovic // *Journal of Food Science.* – 2012a. – V.77. – P. 20–25.
72. **Kosanic, M.** Antioxidant, antimicrobial, and anticancer activities of three *Parmelia species* [Text] / M. Kosanic, B. Rankovic, T. Stanojkovic // *Journal of the Science of Food and Agriculture.* – 2012b. – V.75. – P. 18–23.
73. **Kranner, I.** Biochemical traits of lichens differing in relative desiccation tolerance [Text] / I. Kranner, M. Zorn, B. Turk, S. Wornik, R.P. Beckett, F. Batic // *New Phyt.* – 2003. – V.160. – P. 167–176.
74. **Kurniawati, S.** Efficacy of mediators for enhancing the laccasecatalyzed oxidation of aqueous phenol [Text] / S. Kurniawati, J.A. Nicell // *Enzyme Microb. Technol.* – 2007. – V.41. – P. 353–361.
75. **Kwon, S.I.** Laccase isozymes: Production by an opportunistic pathogen, a *Fusarium proliferatum* isolate from wheat [Text] / S.I. Kwon, A.J. Anderson // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* - 2001. – V.59. – P. 235–242.
76. **Laufer, Z.** Co-occurrence of the multicopper oxidases tyrosinase and laccase in lichens in suborder *Peltigerineae* [Text] / Z. Laufer, R.P. Beckett, F.V. Minibayeva // *Ann. Bot.* – 2006a. – V. 98. – P. 1035–1042.
77. **Laufer, Z.** Occurrence of laccases in lichenized ascomycetes of the *Peltigerineae* [Text] / Z. Laufer, R.P. Beckett, F.V. Minibayeva, S. Lüthje, M. Böttger // *Mycological Research.* – 2006b. – V. 110. – P. 846–853.
78. **Laufer, Z.** Diversity of laccases from lichens in suborder *Peltigerineae* [Text] / Z. Laufer, R.P. Beckett, F.V. Minibayeva, S. Lüthje, M. Böttger // *Bryologist.* – 2009. – V. 112. – P. 418–426.
79. **Leonowicz, A.** Fungal laccase: properties and activity on lignin [Text] / A. Leonowicz, N. Cho, J. Luterek, A. Wilkolazka, M. Wojtas-Wasileowska, A.

- Matuszewska, M. Hofrichter, D. Wesenberg, J. Rogalski // J. Basic Microbiol. – 2001. – V.41. – P. 185–227.
80. **Leonowicz, A.** The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor* [Text] / A. Leonowicz, R.U. Edgehill, J.M. Bollag // Arch. Microbiol. – 1984. – V.137. – P. 89–96.
81. **Lisov, A.V.** Laccases produced by lichens of the order *Peltigerales* [Text] / A.V. Lisov, A.G. Zavarzina, A.A. Zavarzin, A.A. Leontievsky // FEMS Microbiology Letters. – 2007. – V.275. – P. 46–52.
82. **Lücking, R.** Distance, dynamics, and diversity in tropical rainforest: an experimental approach using foliicolous lichens on artificial leaves. I. Growth performance and succession [Text] / R. Lücking, A. Bernecker-Lücking // Ecotropica. – 2002. – V.8. – P. 1–13.
83. **Majeau J.A.** Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants [Text] / J.A. Majeau, K.B. Satinder, D.T. Rajeshwar // Bioresource Technol. – 2010. – V.101 – P. 2331–2350.
84. **Manojlovic, N.** HPLC analysis and cytotoxic potential of extracts from the lichen, *Thamnolia vermicularis* var. *Subuliformis* [Text] / N. Manojlovic, P. Vasiljevic, M. Juskovic, S. Najman, S. Jankovic, A. Milenkovic-Andjelkovic // Journal of Medicinal Plants Research. – 2010. – V.4. – P. 817–823.
85. **Maruyama, T.** Laccase-mediated degradation and reduction of toxicity of the postharvest fungicide imazalil [Text] / T. Maruyama, C. Komatsu, J. Michizoe, S. Sakai, M. Goto // Process Biochem. – 2007. – V.42. – P. 459–461.
86. **Martins, L.O.** Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus Subtilis* endospore coat [Text] / L.O. Martins, C.M. Soares, M.M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G.H. Jones, A.O. Henriques // J. Biol. Chem. – 2002. – V.277. – P. 18849–18859.
87. **Mayer, A.M.** Laccase: new functions for an old enzyme [Text] / A.M. Mayer, R.C. Staples // Phytochemistry. – 2002. – V.60. – P. 551–565.

88. **Messerschmidt, A** Multi-copper oxidases [Text] / A. Messerschmidt // World Scientific. – 1997. – Singapore. – p.250.
89. **Moldes, D.** Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes [Text] / D. Moldes, M. Lorenzo, M.A. Sanromn // Biotechnol. Lett. – 2004. – V.26. – P. 327–330.
90. **Mika, A.** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species [Text] / A. Mika, F.V. Minibayeva, R.P. Beckett, S. Lüthje // Phytochem. Rev. – 2004. – V.3. – P. 173–193.
91. **Mita, N.** Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenols [Text] / N. Mita, S. Tawaki, H. Uyama, S. Kobayashi // Macromol. Biosci. – 2003. – V.3. – P. 253–257.
92. **Musci G** Ceruloplasmin, the unique multi-copper oxidase of vertebrates / G. Musci // Protein Peptide Lett. – 2001. – V.8. – P.159–169.
93. **Nash, T.H.** Lichen Biology [Text] / T.H. Nash // 2<sup>nd</sup> edn. Cambridge University Press. – 2008. – Cambridge. – p.486.
94. **Pezet, R.** Enzymatic detoxication of stilbenes by *Botrytis cinerea* and inhibition by grape berries proanthocyanidins [Text] / R. Pezet, V. Pont, K. Hoang-Van // Recent Advances in Botrytis Research. Pudoc Scientific. – 1992. – Wageningen. – p.92.
95. **Pozdnyakova, N.N.** Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 [Text] / N.N. Pozdnyakova, J. Rodakiewicz-Nowak, O.V. Turkovskaya // J. Mol. Catal. B:Enzym. – 2004. – V.30. – P. 19–24.
96. **Ranocha, P.** Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases – a divergent gene family – in poplar [Text] / P. Ranocha, G. McDougall, S. Hawkins, R. Sterjiades, G. Borderies, D. Stewart, M. Cabanes-Macheteau, A.M. Boudet, D. Goffner // Eur. J. Biochem. – 1999. – V. 259. – P. 485–495.

97. **Rigling, D.** Regulation of laccase biosynthesis in the plantpathogenic fungus *Chryphonectaria parasitica* by double-stranded RNA [Text] / D. Rigling, N.K. Van Alfen // *J. Bacteriol.* – 1991. – V.173. – P. 8000–8003.
98. **Rosconi, F.** Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti* [Text] / F. Rosconi, L.F. Fraguas, G. Martinez-Drets, S.Castro-Sowinski // *Enzyme Microb. Technol.* – 2005. – V.36. – P. 800–807.
99. **Ruiz-Duenas, F.J.** Structural and functional features of peroxidases with a potential as industrial biocatalysts [Text] / F.J. Ruiz-Duenas, A.T. Martinez // *Biocatalysis based on heme peroxidases.* Springer, Berlin Heidelberg, Germany. – 2010. – P. 37–59.
100. **Ryan, D.** Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor* [Text] / D. Ryan, W. Leukes, S. Burton // *Bioresour. Technol.* – 2007. – V.98. – P. 579–587.
101. **Salas, S.D.** Effect of the laccase gene, CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans* [Text] / S.D. Salas, J.E. Bennett, K.J. Kwon-Chung, J.R. Perfect, P.R. Williamson // *J. Exp. Med.* – 1996. – V.184. – P. 377–386.
102. **Schultz, A.** Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase [Text] / A. Schultz, U. Jonas, E. Hammer, F. Schauer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V.67. – P. 4377–4381.
103. **Slomczynski, D.** Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* [Text] / D. Slomczynski, J.P. Nakas, S.W. Tanenbaum // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – V.34. – P. 907–912.
104. **Smirnov, S.A.** Laccases from basidiomycetes: physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds [Text] / S.A. Smirnov, O.V. Koroleva, V.P. Gavrilova, A.B. Belova, N.L. Klyachko // *Biochem.* – 2001. – V.66. – P. 774–779.
105. **Solomon, E.I.** Multicopper oxidases and oxygenases [Text] / E.I. Solomon, U.M. Sundaram, T.E. Machonkin // *Chem. Rev.* – 1996. – V.96. – P. 2563–2605.

106. **Solomon, E.I.** Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins [Text] / E.I. Solomon, P. Chen, M. Metz, S.K. Lee, A.E. Palmer // *Angew. Chem.* – 2001. – V.40. – P. 4570–4590.
107. **Shleev, S.** Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes [Text] / S. Shleev, A. Jarosz-Wilkolazka, A. Khalunina, O. Morozova, A. Yaropolov, T. Ruzgas, L. Gorton // *Bioelectrochemistry.* – 2005. – V.67. – № 1. – P. 115–124.
108. **Shleev, S.** Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible correlation with a resting form of laccase [Text] / S. Shleev, C.T. Reimann, V. Serezhenkov, D. Burbaev, A.I. Yaropolov, L. Gorton, T. Ruzgas // *Biochimie.* – 2006. – V.88. – P. 1275–1285.
109. **Suresh, P.S.** An Insilco approach to bioremediation: laccase as a case study [Text] / P.S. Suresh, A. Kumar, R. Kumar, V.P. Singh // *J. Mol. Graph. Model.* – 2008. – V.26. – P. 845–849.
110. **Torres, E.** Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants [Text] / E. Torres, I. Bustos-Jaimes, S. Le Borgne // *Appl. Catal. B: Environ.* – 2003. – V.46. – P. 1–15.
111. **Thurston, C.F.** The structure and function of fungal laccases [Text] / C.F. Thurston // *Microbiology.* – 1994. – V.140. – P. 19–26.
112. **Triggiani, D.** Antiproliferative activity of lichen extracts on murine myeloma cells [Text] / D. Triggiani, D. Ceccarelli, A. Tiezzi, T. Pisani, S. Munzi, C. Gaggi // *Biologia.* – 2009. – V.64. – P. 59–62.
113. **Verma, M.** Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: Rheology, lytic enzymes and biocontrol activity [Text] / M. Verma, S.K. Brar, R.D. Tyagi, V. Sahai, D. Pruvost, J.R. Valuro, R.Y. Surampalli // *Enzyme Microb. Technol.* – 2007. – V.41 – P. 764–771.
114. **Vranová, E** Signal transduction during oxidative stress [Text] / E. Vranová, D. Inzé, F. Van Breusegem // *J. Exp. Bot.* – 2002. –V.53. – P. 1227–1236.

115. **Walker, J.D.** Effects of chemicals on microorganisms [Text] / J. Water Pollut. Control Fed. – 1988. – V.60. – P. 1190–1106.
116. **Weissman, L.** Rehydration of the lichen *Ramalina lacera* results in production of reactiveoxygen species and nitric oxide and a decrease in antioxidants [Text] / L. Weissman, J. Garty, A. Hochman // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V.71. – P. 2121–2129.
117. **Xu, F.** Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases [Text] / F. Xu // J. Biol. Chem. – 1997. – V.272. – P. 924–928.
118. **Xu, F.** Catalysis of novel enzymatic iodide oxidation by fungal laccase [Text] / F. Xu // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1996b. – V.59. – P. 221–230.
119. **Yang, Y.** Antimicrobial activity of a porcine myeloperoxidase against plant pathogenic bacteria and fungi [Text] / Y. Yang, E. J. Anderson // Journal of Applied Microbiology. – 1999 – V.86. – P. 211–220.
120. **Yoshida, H.** Chemistry of lacquer (Urushi) Part 1. [Text] / H. Yoshida // J. Chem. Soc. – 1883. – V.43 – P. 460–472.
121. **Zavarzina, A.G.** Laccase and tyrosinase activities in lichens [Text] / A.G. Zavarzina, A.A. Zavarzin // Microbiology. – 2006. – V.75. – P. 546–556.