

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук
(ИБФМ РАН)

На правах рукописи

ТРУБИЦИНА ЛЮБОВЬ ИГОРЕВНА

ДВУХДОМЕННЫЕ ЛАККАЗЫ БАКТЕРИЙ РОДА *STREPTOMYCES*:
КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ, ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ

Специальность: 03.01.04 – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Леонтьевский А. А.

Пушино – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1. 1. Лакказы. Определение, классификация.....	9
1. 2. Свойства.....	10
1. 3. Распространение в природе	15
1. 4. Структурная организация и эволюция лакказ	16
1. 5. Трёхдоменные лакказы базидиомицетов	23
1. 5. 1. Структура, клеточная локализация	23
1. 5. 2. Субстраты и ингибиторы	27
1. 5. 3. Физико-химические свойства	28
1. 5. 4. Функции	29
1. 5. 5. Способы получения: индукция, экспрессия	31
1. 6. Бактериальные лакказы.....	32
1. 6. 1. Бактериальные 3д лакказы	33
1. 6. 1. 1. Структура, клеточная локализация.....	33
1. 6. 1. 2. Субстраты и ингибиторы.....	40
1. 6. 1. 3. Физико-химические свойства.....	42
1. 6. 1. 4. Функции	42
1. 6. 1. 5. Способы получения: индукция, суперэкспрессия.....	43
1. 6. 2. Бактериальные 2д лакказы	44
1. 6. 2. 1. Структура, клеточная локализация.....	44
1. 6. 2. 2. Субстраты и ингибиторы.....	48
1. 6. 2. 3. Физико-химические свойства.....	51
1. 6. 2. 4. Функции	52
1. 6. 2. 5. Способы получения: индукция, суперэкспрессия.....	52
1. 7. Каталитические свойства лакказ	54
1. 8. Применение лакказ	58
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	62
2.1. Материалы	62
2.1.1. Реактивы, ферменты, коммерческие наборы	62
2.1.2. Составы сред для культивирования бактерий.....	64
2.1.3. Бактериальные штаммы	64

2.1.4. Оборудование, программы, интернет ресурсы	65
2.2. Методы.....	66
2.2.1. Клонирование генов медьсодержащих оксидаз.....	66
2.2.2. Экспрессия генов медьсодержащих оксидаз в <i>E. coli</i>	68
2.2.3. Очистка рекомбинантных белков.....	71
2.2.4. Характеристика ферментов.....	71
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	76
3.1. Выбор объектов исследования	76
3.2. Клонирование генов двухдоменных лакказ	78
3.3. Экспрессия генов, очистка рекомбинантных белков	82
3.4. Характеристика рекомбинантных белков	87
3.4.1. Молекулярные свойства белков	87
3.4.2. Физико-химические свойства ферментов.....	88
3.4.3. Спектральные свойства ферментов.....	93
3.4.4. Каталитические свойства ферментов.....	93
3.5. Кристаллизация рекомбинантных лакказ.....	96
3.6. Обесцвечивание трифенилметановых красителей	98
4. ОБУСЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	101
4.1. Выбор объектов исследования и методики работы.....	101
4.2. Клонирование и экспрессия генов 2д лакказ	101
4.3. Очистка и характеристика 2д лакказ	104
4.4. Кристаллизация 2д лакказ.....	110
4.5. Обесцвечивание трифенилметановых красителей 2д лакказами.....	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	115
ВЫВОДЫ	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Лакказа (К.Ф.1.10.3.2, *пара*-дифенол: кислород оксидоредуктаза) – фермент, относящийся к семейству т.н. «голубых» оксидаз, содержащих в активном центре по четыре атома меди, организованные в одноядерный монокластер (Т1-металлоцентр, один атом меди) и трёхядерный кластер, состоящий из Т2-металлоцентра (один атом меди) и Т3-металлоцентра (два атома меди). Лакказа катализирует окисление широкого спектра фенольных и нефенольных субстратов. Конечным акцептором электронов в данных реакциях является кислород, который восстанавливается до воды. Лакказы обнаружены у грибов, бактерий, растений и насекомых.

Наиболее изученными считаются лакказы грибов-базидиомицетов. Молекулярная масса (ММ) грибных лакказ составляет 60-70 кДа. Они являются гликопротеинами (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Типичные грибные лакказы – мономеры, известны отдельные сообщения о димерных лакказах (Wahleithner *et al.*, 1996; Min *et al.*, 2001). Единый полипептид мономера лакказы содержит три домена. Грибные лакказы более стабильны при нейтральных значениях pH, но более активны в диапазоне pH 4,5-5,0, имеют температурный оптимум 40-60°C и широкий разброс характеристик термоинактивации (Baldrian, 2006; Kunamneni *et al.*, 2007). Все лакказы принято разделять на группы низко- (350-450 мВ), средне- (450-550 мВ) и высоко-редокspotенциальных (550-850 мВ) ферментов (Mot and Silaghi-Dumitrescu, 2012). Высоко-редокspotенциальные лакказы встречаются, обычно, у базидиальных грибов. Относительно высокий окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) лакказ в сочетании с низкой субстратной специфичностью объясняет способность лакказ окислять широкий спектр устойчивых субстратов как природного, так и неприродного происхождения (Kunamneni *et al.*, 2007).

Бактериальные лакказы были открыты сравнительно недавно. Впервые лакказная активность была обнаружена у бактерии *Azospirillum lipoferum* (Givaudan *et al.*, 1993). Анализ *in silico* бактериальных геномов выявил широкое распространение предположительно лакказ у представителей α -, ε - и γ -протеобактерий и других прокариот (Alexandre and Zhulin, 2000). Затем последовала серия работ по очистке и характеристике бактериальных лакказ. Ферменты были охарактеризованы у представителей родов *Bacillus*, *Streptomyces*, *Thermus* и др. (Santhanam *et al.*, 2011). Анализ полученных данных указал как на существование аналогов грибных лакказ, имеющих три домена в структуре мономера, так и на наличие новых необычных форм лакказ, мономеры которых состоят только из двух доменов.

Большинство двухдоменных (2д) лакказ были выделены из бактерий – представителей рода *Streptomyces*. В настоящее время охарактеризованы всего семь 2д лакказ: оксидаза из *Nitrosomonas europaea* (DiSpirito *et al.*, 1985), EpoA из *S. griseus* (Endo *et al.*, 2003), SilA из *S. ipomoea* (Molina-Guijarro *et al.*, 2009), SLAC из *S. coelicolor* (Machczynski *et al.*, 2004), Ssl1 из *S. sviveus* (Gunne and Urlacher, 2012), LMCO из *S. pristinaespiralis* (Ihssen *et al.*, 2015) и MCO из *S. griseorubens* (Feng *et al.*, 2015). У 2д лакказ MM составляет 32-44 кДа, сведений о возможном наличии углеводных компонентов нет. Белки более стабильны при нейтральных-щелочных значениях pH, температурный оптимум составляет 40-60°C. Наиболее термостабильным, до публикации наших работ, считался фермент MCO, сохранявший 52% активности после инкубирования при 70°C в течение 2 ч (Feng *et al.*, 2015). ОВП 2д лакказ был определён у двух ферментов и составлял 0,43-0,5 В в случае SLAC (Machczynski *et al.*, 2004; Gallaway *et al.*, 2008) и 0,375 В у Ssl1 (Gunne *et al.*, 2014).

Лакказам находят практическое применение в различных отраслях промышленности: пищевой, текстильной, целлюлозно-бумажной (Couto and Herrera, 2006). Кроме того, фермент используют в целях биоремедиации (Duran and Esposito, 2000), для химического синтеза лекарственных препаратов (Kunamneni *et al.*, 2008a), в составе моющих и косметических средств (Pezzella *et al.*, 2015). При применении лакказ в биотехнологиях используют такие их преимущества, как высокий ОВП, широкую субстратную специфичность, стабильность, отсутствие необходимости использования дорогих кофакторов. А использование редокс-медиаторов делает практическое применение лакказ еще более привлекательным: пара лакказа/медиатор обычно имеет более высокий ОВП, чем у собственно лакказы. Опыт применения лакказ и других ферментов в технологических процессах привел к формированию набора требований, которым, зачастую, свойства природных ферментов не соответствуют. Это сочетание высокого редокс-потенциала со способностью работать при нейтральных значениях pH для снижения интенсивности коррозии оборудования, нечувствительность к хлоридам, азидам и цианидам, которые в низких концентрациях могут присутствовать в технологических растворах, устойчивость к высоким температурам технологических растворов. В наибольшей степени такой набор свойств характерен для 2д бактериальных лакказ, которые проигрывают трёхдоменным (3д) грибным лакказам только по величине ОВП. Но и этот недостаток может быть скомпенсирован применением правильно подобранных медиаторов.

В связи с вышесказанным, поиск и характеристика новых 2д бактериальных лакказ весьма актуальны, так как пока известны неполные характеристики всего семи 2д лакказ бактерий. Исследование новых 2д лакказ позволит обнаружить ферменты, обладающие свойствами, которые будут более точно соответствовать требованиям промышленности.

Цель и задачи исследования.

Целью настоящей работы было получение и характеристика бактериальных двухдоменных лакказ из бактерий – представителей рода *Streptomyces*.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Выбор штаммов бактерий рода *Streptomyces* – носителей генов двухдоменных лакказ и клонирование генов 2д лакказ стрептомицетов.
2. Создание штаммов с повышенной экспрессией целевых генов и разработка схемы очистки полученных рекомбинантных ферментов.
3. Исследование физико-химических свойств, определение каталитических характеристик ферментов.
4. Подбор условий кристаллизации двухдоменных лакказ стрептомицетов.
5. Анализ моделей трёхмерных структур 2д лакказ стрептомицетов в сравнении с пространственными моделями классических трёхдоменных лакказ грибов.
6. Изучение причин устойчивости 2д лакказ к действию ингибитора азиды натрия
7. Изучение возможности повышения окислительно-восстановительного потенциала двухдоменных лакказ при использовании подходящего медиатора.

Научная новизна.

Из двух штаммов бактерий рода *Streptomyces* были клонированы гены двухдоменных бактериальных лакказ. Получены, охарактеризованы и закристаллизованы две новые бактериальные лакказы. Впервые обнаружена и охарактеризована термостабильная бактериальная 2д лакказа, способная сохранять высокую активность после кипячения в течение часа. Обнаружена устойчивость 2д лакказ к азиду и фториду натрия как в щелочных, так и кислых условиях, а также способность сохранять активность при нейтральном значении рН. Для этих ферментов была обнаружена низкая активность по отношению к фенолам, ароматическим карбоновым кислотам. Установлено, что для формирования крупных кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа у разных 2д лакказ имеет значение как наличие, так и отсутствие сигнального пептида в аминокислотной последовательности рекомбинантного белка. Также впервые обнаружена причина низкой чувствительности 2д лакказ к ингибитору азиду натрия: его связывание в необычном участке активного центра и невозможность проникновения по субстратному каналу к T2/T3-центру из-за наличия отрицательно заряженных и полярных аминокислот, формирующих стенки канала.

Научно-практическая значимость.

У охарактеризованных 2д лакказ обнаружено сочетание высокой термостабильности, низкой субстратной специфичности, способности работать при нейтральном и щелочном

значениях pH и устойчивости к ингибиторам (азиду и фториду). Совокупность этих свойств делает 2д лакказы бактерий весьма привлекательными инструментами в биотехнологических процессах.

Известно, что 2д бактериальные лакказы обладают низким ОВП. Показанная нами низкая окислительная активность 2д лакказ стрептомицетов в отношении фенольных соединений подтверждает это явление. Для повышения ОВП 2д лакказ в составе пары лакказа/медиатор нами был проведен поиск подходящего медиатора из числа известных медиаторов 3д лакказ грибов. На примере реакций обесцвечивания трифенилметановых красителей в качестве наиболее эффективного медиатора был отобран 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин сульфоновая кислота) (АБТС), повышающий ОВП до 0,7 В. Новая лакказа *Streptomyces griseoflavus* Ac-993 была защищена патентом (Юревич Л.И. и др., 2015).

Личный вклад диссертанта. Диссертантом выполнены: поиск генов 2д лакказ, клонирование и экспрессия генов 2д лакказ; очистка и характеристика ферментов; участие в поиске условий для кристаллизации лакказ, анализ трёхмерных структур лакказ; подготовка материалов для публикации в научных журналах.

Связь с государственными программами. Работа выполнена при финансовой поддержке: Государственного контракта от 1 марта 2011 г. № 16.512.11.2173 «Исследование структурно-функциональных свойств различных типов лакказ бактерий рода *Streptomyces*» (проект № 14-24-00172); Государственного контракта с Министерством образования и науки Российской Федерации № 16.М04.11.0010 от 29 апреля 2011 г. «Разработка технологий получения ферментных препаратов для сельского хозяйства»; гранта У.М.Н.И.К. Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, Госконтракт № 7360р/10168, «Разработка продуцента оксидазы бактерий рода *Streptomyces*», 2009-2011 гг.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на шести конференциях: 15-я, 16-я и 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21-го века» (Пущино, 2011; 2012, 2015), VIII Молодёжная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2012), Международная научная конференция: «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Беларусь, Минск, 2013), II Пущинская школа-конференция "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов" (Пущино, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них три статьи в рецензируемых изданиях, входящих в список рекомендованных ВАК, и один патент.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из восьми разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение

результатов, заключение, выводы, список литературы. Работа изложена на 147 страницах, содержит 22 таблицы и 41 рисунок. Библиографический указатель содержит 328 источников литературы.

Место проведения работы и благодарности. Работа выполнена в лаборатории микробной энзимологии ФГБУН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН). Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю д.б.н. Леонтьевскому А.А. и всему коллективу лаборатории микробной энзимологии за практическую помощь, ценные советы и поддержку при написании диссертации. Отдельную благодарность выражаю с.н.с., к.б.н. Лисову А.В. за помощь в овладении методами исследования ферментов и активное обсуждение результатов и с.н.с., к.б.н. Захаровой М.В. за помощь в проведении молекулярно-биологических работ; коллективу лаборатории молекулярной микробиологии и лаборатории радиоактивных изотопов за предоставленную материальную базу для проведения части работы; сотрудникам лаборатории структурных исследований аппарата трансляции ФГБУН Института белка Российской академии наук (ИБ РАН) д.б.н. Тищенко С.В. и к.ф.-м.н. Габдулхакову А.Г. за работу по кристаллизации ферментов и решение пространственной структуры белков. Особую благодарность выражаю своим близким – мужу, Трубицину И.В., детям, Трубициным Е.И. и А.И., и родителям за внимание, поддержку и помощь.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1. Лакказы. Определение, классификация

Лакказа (*para*-дифенол: кислород оксидоредуктаза, К.Ф.1.10.3.2) – это медьсодержащая оксидаза, катализирующая окисление широкого ряда органических и неорганических субстратов с восстановлением кислорода до воды.

Лакказа относится к семейству голубых медьсодержащих белков (ГМБ), содержащих от 1 до 6 атомов меди молекулу белка. В состав семейства ГМБ входят группы малых голубых белков, голубых оксидаз и нитратредуктаза (рис. 1). Малые голубые белки с ММ 10-16 кДа содержат по одному атому меди. Например, пластоцианин (переносчик электронов в фотосинтетической электрон-транспортной цепи у растений и водорослей), амицианин (переносчик электронов у бактерий), азурин (переносчик электронов у некоторых растений и бактерий), псевдоазурин (переносчик электронов у денитрифицирующих бактерий), стеллацианин (точная функция неизвестна, распространён у растений) и рустицианин (переносчик электронов у бактерий) (Nersissian and Shipp, 2002).

Представитель ГМБ с двумя атомами меди – нитритредуктаза (CuNIR) (Adman and Murphy, 2001). Это фермент широко распространён у прокариот (La Croix *et al.*, 1996). Фермент CuNIR катализирует восстановления нитрита до монооксида азота, принимая электрон от цитохрома *c* (Martinez-Espinosa *et al.*, 2006).

Кроме малых голубых белков в семейство ГМБ входят медьсодержащие (многомедные) оксидазы, т.н. «голубые оксидазы», к которым относится и лакказа. К данной группе относят ферменты, содержащие от 4 до 6 атомов меди, организованных в металлоцентры 3-х типов, которые имеют характерные спектральные свойства (Messerschmidt and Huber, 1990). Группа голубых оксидаз, помимо лакказы, также включает в себя феррооксидазу (К.Ф. 1.16.3.1.), или церулоплазмин плазмы крови млекопитающих (ЦП), который содержит 6 атомов меди на одну полипептидную цепь (Calabrese *et al.*, 1989), билирубиноксидазу (К.Ф. 1.3.3.5), аскорбатоксидазу (АО) (К.Ф. 1.10.3.3.), медьсодержащую оксидазу CueO из *E. coli* и др. ферменты и белки, содержащие по 4 атома меди на полипептидную цепь (Messerschmidt *et al.*, 1989; Messerschmidt and Huber, 1990; Grass and Rensing, 2001).

Лакказа катализирует четырёхэлектронное восстановление молекулы кислорода до двух молекул воды, минуя стадию образования пероксида водорода. При этом происходит одноэлектронное окисление широкого спектра субстратов: фенолов и ароматических аминов, а также неорганических соединений (Морозова *и др.*, 2007). С функциональной точки зрения, за

способность окислять дигидроксифенолы, лакказы относят к группе полифенолоксидаз. Вместе с катехол оксидазой (*орто*-дифенол: кислород оксидоредуктаза, К.Ф. 1.10.3.1.) – ключевым ферментом синтеза меланина, лакказа составляет группу полифенолоксидаз (рис.1).

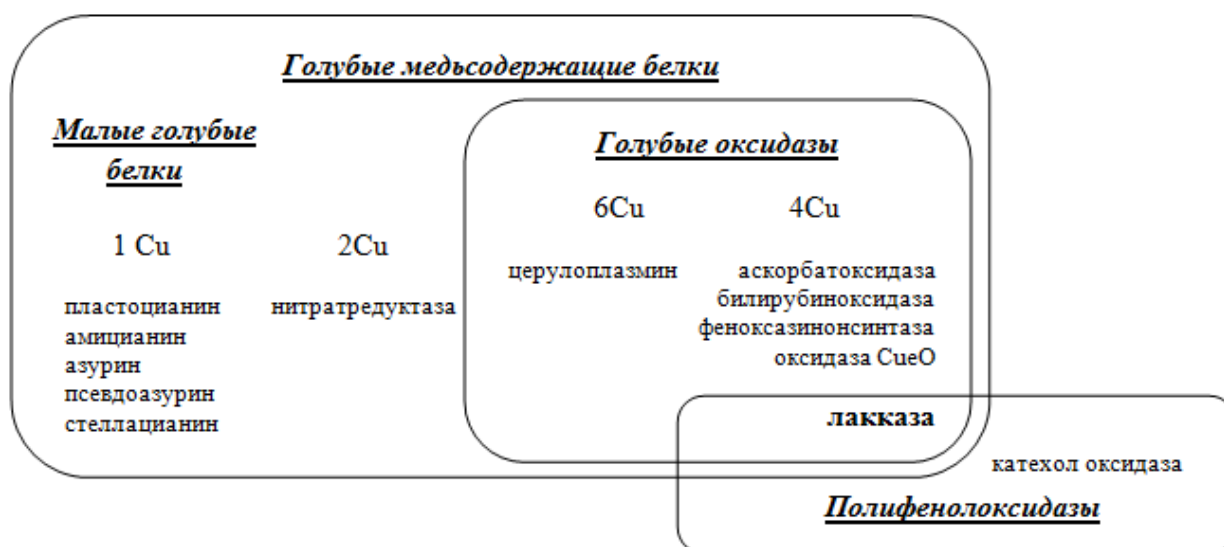


Рисунок 1. Положение лакказы по отношению к различным группам медьсодержащих белков.

1. 2. Свойства

Лакказа, как представитель медьсодержащих оксидаз, несущих 4 атома меди в активном центре, имеет свойства, характерные для всех представителей группы, в частности, имеет консервативный медь-связывающий мотив, участвующий в хелатировании меди (десять гистидинов и один цистеин), восстанавливает молекулярный кислород до воды, имеет характерный спектр поглощения. Лакказа, как представитель группы полифенолоксидаз, вместе с катехол оксидазой окисляет перекрывающийся набор субстратов, а ферменты различают на основании активности в отношении специфических соединений (Walker and McCallion, 1980).

Существует ряд свойств, характерных для всех лакказ. Во-первых, активный центр лакказы содержит 4 атома меди, формирующие медные центры: T1, несущий 1 атом меди, T2, также содержащий 1 атом меди, и T3, несущий 2 атома меди. Все атомы меди находятся в степени окисления 2+. Три иона меди T2- и T3-центров сближены на расстояние, не превышающее 3,8 Å, образуя T2/T3-трёхъядерный кластер, тогда как ион меди центра T1 расположен от них на расстоянии не менее 13 Å (Palmer *et al.*, 2001). Лигандами T1-центра являются два имидазола гистидина и сульфгидрильная группа цистеина, которые образуют тригональную структуру (Larrabee and Spiro, 1979). Для грибных лакказ характерно наличие

лейцина или фенилаланина в качестве дополнительного лиганда T1-медного центра (Claus, 2004). Лигандами T2/T3-кластера являются восемь имидазолов гистидина (Solomon *et al.*, 1996; Messerschmidt and Huber, 1990). Одиннадцать аминокислот, участвующих в связывании меди, а именно десять остатков гистидина и один остаток цистеина, консервативны у всех лакказ. Также консервативны небольшие последовательности в четырёх регионах, определяющих микроокружение атомов меди. Рисунок 2 иллюстрирует схематическое изображение активного центра лакказы базидиомицета *Coriolus zonatus* и расположение лигандов металлоцентров.

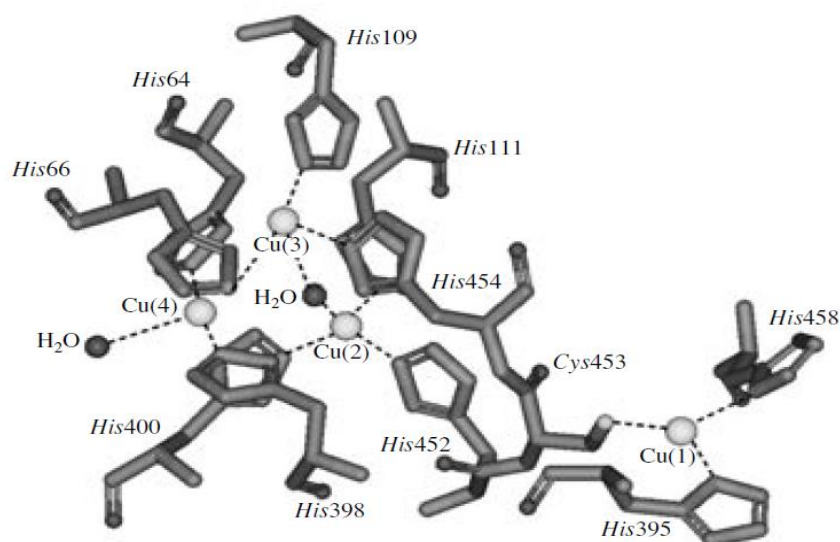


Рисунок 2. Схематическое изображение медных центров лакказы *Coriolus zonatus*. T1 (Cu1), T2/T3 (Cu4/Cu2-Cu3), Cu1-4 – атомы меди (Lyashenko *et al.*, 2006).

Во-вторых, лакказы имеют характерные спектральные свойства (Solomon *et al.*, 1996; Malmstrom, 1982; Reinhammar and Vanngard, 1971). T1-медный центр («голубой» медный центр) определяет интенсивный голубой цвет растворов фермента и максимум при 600 нм в спектре поглощения с коэффициентом молярной экстинкции около $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Также он характеризуется слабым параллельным сверхтонким расщеплением в спектрах электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) (Solomon *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 1992; Quintanar *et al.*, 2005) (Malkin and Malmstrom, 1970) (рис. 3). T2 – Моноядерный медный центр, не проявляющийся в спектре поглощения, в спектре ЭПР характеризуется параллельным сверхтонким расщеплением, который является типичным для ионов меди в тетрагональных комплексах, сформированных подходящими хелаторами (Solomon *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 1992; Quintanar *et al.*, 2005) (рис. 3). T3 – Биядерный медный центр, в котором ионы двухвалентной меди спарены антиферромагнитно через гидроксидный мостик. В результате этот центр является диамагнитным и не детектируется на спектрах ЭПР. T3-металлоцентр

характеризуется наличием плеча на спектре оптического поглощения с коэффициентом экстинкции около $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 330 нм (Solomon *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 1994) (рис. 3).

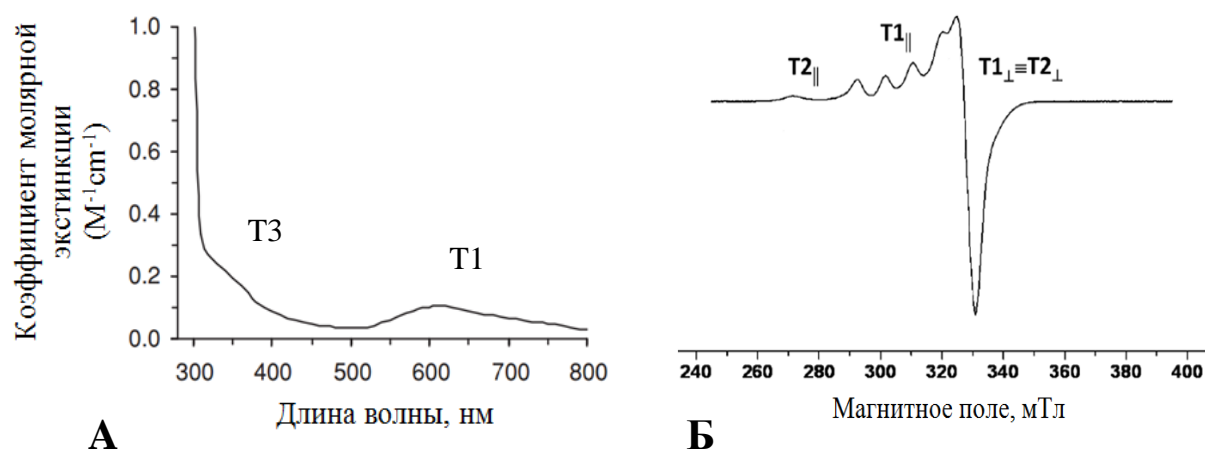


Рисунок 3. Спектральные свойства лакказы. **А.** Спектр поглощения лакказы базидиомицета *Grifola frondosa* (Nitheranont *et al.*, 2011). **Б.** ЭПР-спектр лакказы базидиомицета *Corioloopsis gallica* при 9,40 ГГц (Pogni *et al.*, 2015).

В-третьих, каталитический цикл лакказы заключается в окислении субстратов-доноров электрона, последующем связывании молекулы кислорода и ее восстановлении до двух молекул воды (Reinhammar, 1984). Связывание кислорода осуществляется на T2/T3-медном кластере. Электроны, необходимые для восстановления кислорода, поступают от T1-медного центра. Источником электронов для T1-медного центра являются одноэлектронно окисляемые субстраты (рис. 4). Связывание субстратов происходит в субстрат-связывающем кармане, ведущем к T1-центру. T1-центр, принимающий электроны от редуцирующих субстратов, погружён в белковую глобулу. С него электроны переносятся на трёхъядерный T2/T3-кластер, связывающий и активирующий кислород для восстановления его до воды. Путь переноса электронов от атома меди T1-центра к T2/T3-кластеру, идёт через остатки аминокислот цистеина и гистидина (T1-Cys-His-T3) (Messerschmidt *et al.*, 1992).

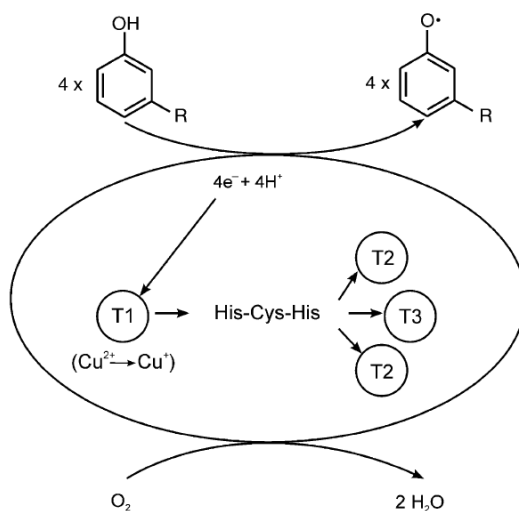


Рисунок 4. Каталитический цикл лакказы (Baldrian, 2006).

При взаимодействии полностью восстановленной лакказы с молекулярным кислородом происходит образование промежуточных форм фермента. Две хорошо изученные формы – пероксидный (Cole *et al.*, 1990, 1991; Shin *et al.*, 1996) и нативный интермедиаты (Lee *et al.*, 2002; Quintanar *et al.*, 2005; Bento *et al.*, 2005; Rulisek *et al.*, 2005).

Рисунок 5 иллюстрирует механизм четырёхэлектронного восстановления молекулы кислорода до двух молекул воды с участием лакказы (Shleev *et al.*, 2006). Полностью восстановленный трёхъядерный медный кластер лакказы T2/T3 взаимодействует с молекулярным кислородом с образованием пероксидного интермедиата. При использовании лакказы, в которой T1-ион меди был заменён на ион ртути Hg^{2+} , не способный передавать электроны (Morie-Bebel *et al.*, 1986), было показано, что между восстановленным T2- и окисленным T3-центром образуется пероксидный мостик (Palmer *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 1996). Данный интермедиат переходит в промежуточное соединение, подобное нативному интермедиату лакказы с четырьмя ионами меди в активном центре. Образование нативного интермедиата (в T1-Cu-лакказе) и пероксидного (в T1-Hg-лакказе) зависит от концентрации молекулярного кислорода, и константы скорости второго порядка для этих реакций сопоставимы. Было высказано предположение, что пероксидный интермедиат содержит ион O_2^{2-} , один из атомов кислорода которого связан с ионом меди T2-центра и с одним из ионов меди T3, а второй координирован вторым ионом меди T3-центра (Rulisek *et al.*, 2005; Shleev *et al.*, 2006). Таким образом, в нативном интермедиате ионы меди T3-медного центра находятся в полностью окисленном состоянии, а T1- и T2-центров – в восстановленном (Solomon *et al.*, 2001; Ferraroni *et al.*, 2007; Ferraroni *et al.*, 2012).

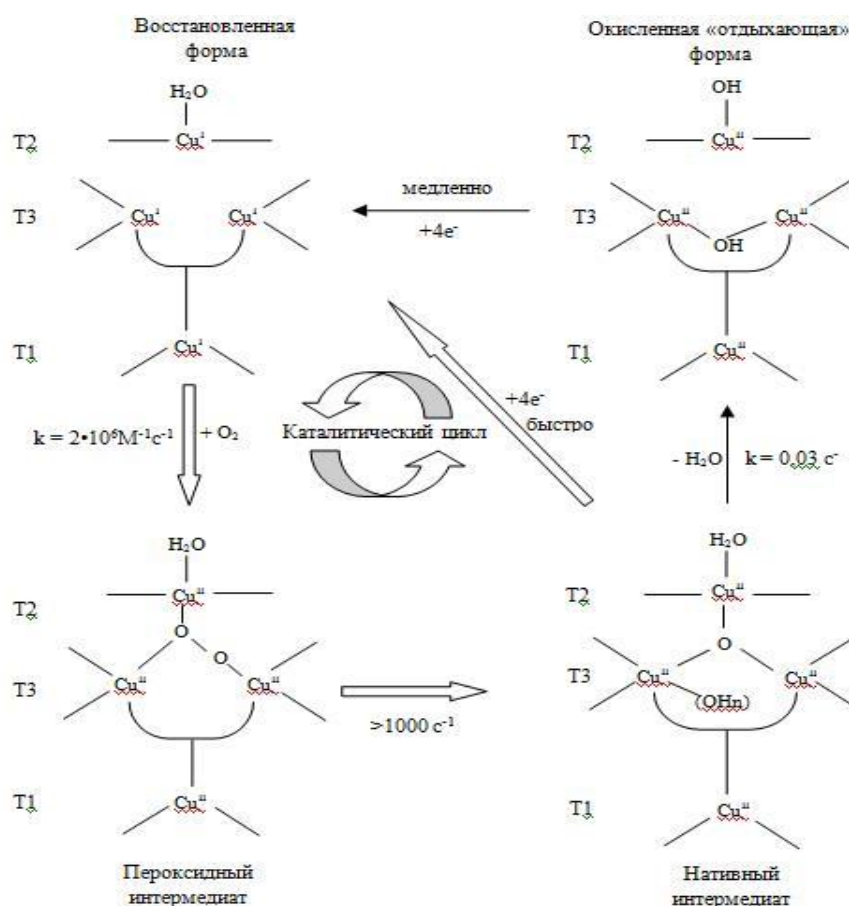


Рисунок 5. Каталитический цикл лакказы (Shleev *et al.*, 2006).

При расщеплении пероксидной O-O-связи при переходе от пероксидного к нативному интермедиату, вероятно, происходит одноэлектронный восстановительный распад пероксида (Palmer *et al.*, 2001). При этом степень окисления всех ионов меди активного центра составляет 2+. Нативный интермедиат может медленно трансформироваться в «покоящуюся» форму лакказы. Для покоящейся формы также характерна степень окисления всех ионов меди активного центра 2+, и наличие только одного атома кислорода в форме OH- или H₂O, связанного с T2-медным центром (Messerschmidt *et al.*, 1992). T1-центр такой формы фермента может быть восстановлен субстратом, но скорость переноса электрона на трёхъядерный медный кластер в данном случае очень низкая (Lee *et al.*, 2002; Solomon *et al.*, 1996).

В-четвёртых, все лакказы неспецифичны в отношении окисляемых соединений, причем даже сравнительно близкородственные лаккзы (например, 3д лакказы базидиомицетов), могут катализировать окисление заметно различающегося перечня субстратов. При этом два субстрата, окисляемые всеми лакказами – АБТС и 4-гидрокси-3,5-диметоксибензальдегид азин (сирингальдазин), имеют статус тестовых. Полный перечень субстратов, окисляемых лакказами различного происхождения, будет рассмотрен ниже.

В-пятых, эффективными ингибиторами классических 3д лакказ грибов и других лакказ являются азид натрия, тиомаляновая кислота и цианид калия. Они представляют группу «сильных» ингибиторов лакказ. Обычно лакказа полностью ингибируется даже низкими концентрациями указанных соединений (до 1 мМ). К «слабым» ингибиторам лакказ принято относить додецилсульфат натрия (ДДС-Na), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), которые и в более высоких концентрациях (например, 10 мМ и выше) не полностью ингибируют активность лакказы.

1. 3. Распространение в природе

Лакказы были обнаружены у высших растений, грибов, бактерий, насекомых, лишайников, губки, водорослей (Baldrian, 2006; Lisov *et al.*, 2007, Otto and Schlosser, 2014; Li *et al.*, 2015). Лакказная активность продемонстрирована у многих видов высших грибов, относящихся к классам аскомицетов и базидиомицетов. Лакказы не характерны для низших грибов классов зигомицетов и хитридиомицетов. Хорошо изучены лакказы аскомицетов из родов *Melanocarpus*, *Aspergillus*, *Curvularia*, и *Penicillium*, а также базидиомицетов из родов *Agaricus*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Cerrena*, *Trametes*. Если рассматривать физиологическую классификацию грибов, то продукция лакказ особенно характерна для деструкторов древесины, способных разлагать лигнин, – базидиомицетов, вызывающих т.н. белую гниль древесины. Данная группа грибов разлагает лигнин в составе лигноцеллюлозных материалов с использованием комплекса разных лигнинолитических ферментов класса оксидоредуктаз, включая и лакказы (Leonowicz *et al.*, 2001).

Лакказа растительного происхождения из сока японского лакового дерева *Rhus vernicifera* – самая первая лакказа, охарактеризованная еще в 1883 г (Yoshida, 1883). Растительные лакказы встречаются у различных видов лакового дерева рода *Rhus*, у бирманского лакового дерева рода *Melanorrhoea*, клёна (Sterjiades *et al.*, 1992), сосны (Bao *et al.*, 1993), ксерофита опунции (Kumar and Srikumar, 2011), резуховидки из семейства капустные (Berthet *et al.*, 2011). Обнаружение участия лакказы в лигнификации клеточных стенок указывает на возможно более широкое распространение лакказы у растений (Sterjiades *et al.*, 1992; Bao *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2013).

Фенолоксидазы с «лакказными свойствами» были обнаружены у насекомых (Asada *et al.*, 2004; Gianfreda *et al.*, 1999; Mayer and Staples, 2002). Лакказы идентифицированы в слюне и слюнных железах зелёной рисовой цикадки (Hattori *et al.*, 2010), у хрущака малого булавоусого (Gorman *et al.*, 2012), малярийного комара (Lang *et al.*, 2012), бражника табачного (Dittmer *et al.*,

2009), термита (Coy *et al.*, 2010).

Появились данные о наличии лакказы у водорослей и губок. Охарактеризованный фермент с лакказными свойствами получен из зелёной водоросли *Tetracystis aeria* (Otto *et al.*, 2010; Otto and Schlosser, 2014), а также из морской губки *Suberites domuncula* (Li *et al.*, 2015).

Наличие лакказ у прокариот долго подвергалось сомнению. Анализ *in silico* нуклеотидных последовательностей генов прокариот на наличие участков, идентичных консервативным мотивам грибных лакказ, обнаружил присутствие генов, предположительно лакказ, среди представителей α -, ε - и γ -протеобактерий, грамположительных бактерий с высоким уровнем содержания нуклеотидов GC, представителей порядка *Aquificales* (Alexandre and Zhulin, 2000). Последовавшие работы по выделению и характеристике лакказ бактериального происхождения подтвердили широкое распространение ферментов среди прокариот. Лакказы были обнаружены у представителей семейства *Bacillus* (Hullo *et al.*, 2001; Koschorreck *et al.*, 2008), *Streptomyces* (Arias *et al.*, 2003; Endo *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003; Machczynski *et al.*, 2004; Molina-Guijarro *et al.*, 2009), *Thermus* (Miyazaki, 2005, Liu *et al.*, 2015), у *Stenotrophomonas maltophilia* (Galai *et al.*, 2008), *Ochrobactrum* sp. (Li *et al.*, 2012) и у многих других прокариот.

1. 4. Структурная организация и эволюция лакказ

Голубые медьсодержащие белки (ГМБ) – группа белков, представленная малыми голубыми белками, несущими один атом меди на молекулу (1Cu), голубыми оксидазами (ГО), а также CuNIR, имеющей два атома меди на молекулу белка (рис. 1). ГО, в свою очередь, подразделяются на белки, имеющие от четырёх до шести атомов меди на молекулу (4Cu-6Cu). Характерной чертой, объединяющей все ГМБ, является их структурная организация. Все ГМБ имеют доменную структуру. Представители ГМБ с 1Cu – однодоменные белки. CuNIR – двухдоменный белок. Представители ГМБ с 4Cu – трёхдоменные белки. Представители ГМБ с 6Cu – белки с шестью доменами (рис. 6).

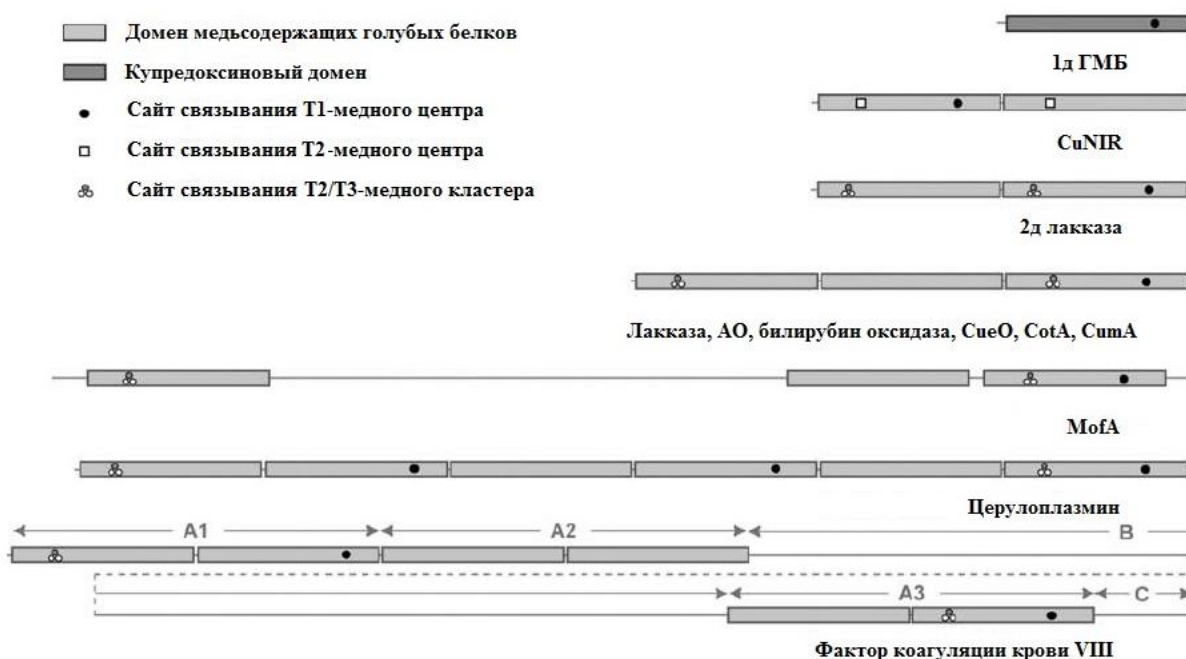


Рисунок 6. Доменная организация представителей семейства голубых медьсодержащих белков (Nakamura and Go, 2005).

Название домена, в составе которого имеется единственный медный металлоцентр 1 типа, – купредоксиновый домен (КД), – происходит от названия однодоменного малого голубого белка, купредоксина. В его основе лежат восемь бета-структур, которые представляют собой консервативное ядро КД. КД может прочно связывать 1 атом меди, который формирует медный центр 1 типа (Т1-центр) и обеспечивает характерный голубой цвет раствора белка. Не все КД несут Т1-медный центр. Некоторые домены вообще не участвуют в связывании атома меди, или, в комплексе с другими доменами, принимают участие в хелатировании атомов меди (связывание междоменного Т2-центра или Т2/Т3-медного кластера). Установлено, что домены двух-, трёх-, и шестидоменных белков являются гомологами КД и также в своей структуре несут по восемь бета-структур. Степень гомологии КД по аминокислотной последовательности может составлять 10% и выше (Nersissian and Shipp, 2002). Таким образом, одиночные КД представляют собой 1Cu ГМБ, а сочетание нескольких КД формирует мультидоменные ГМБ. КД в структуре мультидоменных белков могут быть также связаны с аминокислотными последовательностями, не являющимися аналогами КД. Примерами таких белков служат MofA (3 КД) из *Leptothrix discophora* (Corstjens *et al.*, 1992) и фактор коагуляции крови VIII (6 КД) (Shen *et al.*, 2008).

Лакказы грибов, насекомых и растений являются типичными представителями ГМБ, построенных из трёх доменов. Бактериальные лакказы можно подразделять на 3д и 2д белки. Последние несут два КД и активны в форме гомотримера.

Согласно известной классификации (Murphy *et al.*, 1997), все КД можно разделить на пять классов. Первый класс включает однодоменные (1д) белки – переносчики электронов, такие как псевдоазурин, пластоцианин или амицианин. Домены терминальной цитохромоксидазы бактерий, несущие T2/T3-медный центр, и домен хинолоксидазы составляют второй класс. Третий класс составляет домен азурин, который отличается от других однодоменных белков – переносчиков электронов из первого класса. Четвёртый класс включает первый домен CuNIR, АО и лакказы, а также домены 1, 3 и 5 ЦП. Последний, пятый класс, представлен вторым и третьим доменами лакказы и АО, вторым доменом CuNIR, а также 2, 4 и 6 доменами ЦП. К тому же к пятому классу относится однодоменный белок рустицианин.

Современные мультидоменные ГМБ эволюционно могли иметь однодоменного общего предка. Всевозможные модификации исходного домена, а именно мультипликация, формирование сайтов связывания T2-медного центра и T2/T3-медного кластера, а также формирование субстрат-связывающих сайтов могли привести к формированию всего разнообразия мультидоменных ГМБ. Белок рустицианин, который по структуре и последовательности КД очень схож с доменами CuNIR, АО, лакказы (Kanbi *et al.*, 2002), а также ЦП, мог выступать в качестве исходного домена.

Согласно эволюционной гипотезе Ryden и Hunt, формирование современных 3д растительных и грибных медьсодержащих оксидаз, а также шестидоменной (6д) структуры ЦП (более 1000 аминокислотных остатков (а.о.)) произошло благодаря дупликации исходного однодоменного белка (100 а.о.) (Ryden and Hunt, 1993). Причём, перед первой дупликацией имело место увеличение исходного домена. А после первой дупликации произошла вторая дупликация одного из доменов, продукт которой дал начало 3д белкам (АО, лакказы). 2д Белок, сформировавшийся после первой дупликации, соответствовал двум доменам ЦП. Последующая двойная дупликация 2д белка с потерей медь-связывающих участков N-концевым мотивом белка привела к возникновению 6д ЦП, в структуре которого только 3 домена связывали T1-медный центр. Формирование комплексных белков, например, фактора коагуляции крови VIII, происходило благодаря соединению аминокислотной последовательности КД с другой аминокислотной последовательностью, существующей в геноме. Схематично суть гипотезы представлена на рисунке 7. Согласно классификации Murphy, домен, который образовался первым, относился к V классу. Затем после дупликации исходного гена образовался домен из класса IV. После образования 2д белка (1 домен V, второй домен IV) произошло формирование

T2/T3-медного сайта за счёт присоединения лигандов к обоим доменам. В результате сформировался 2д функциональный белок. От него произошла структура 6д ЦП через 2 дубликации, а затем произошла потеря T1-медных центров доменами из класса IV. АО и лакказы сформировались путём удвоения одного домена 2д белка.

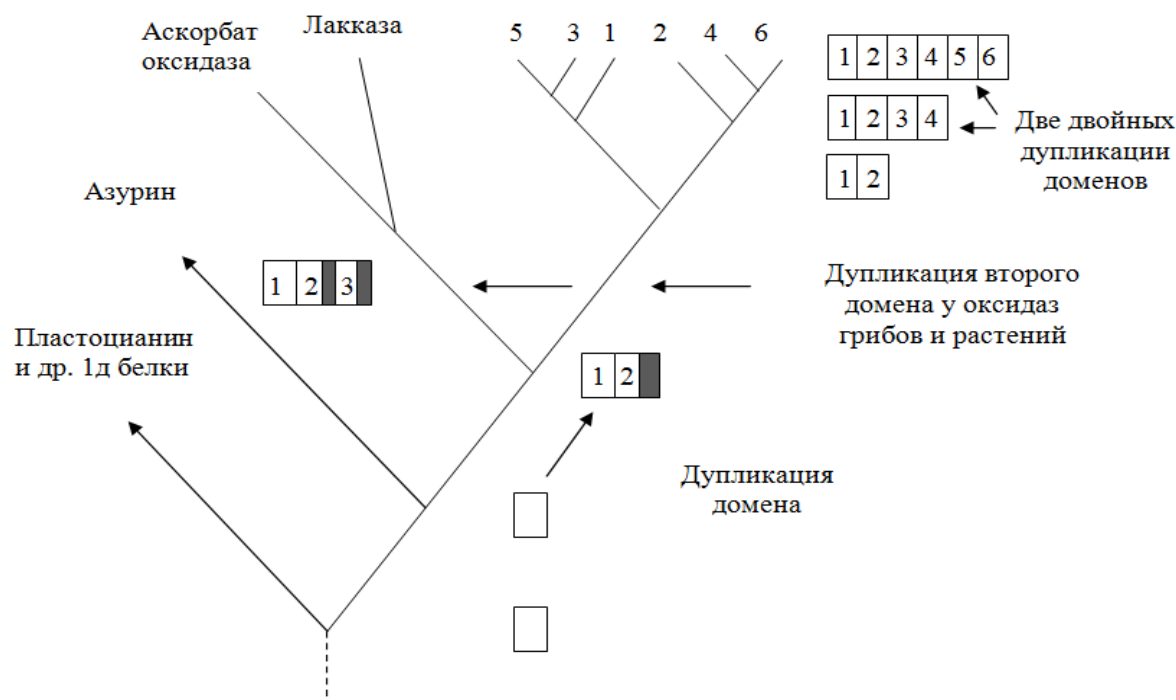


Рисунок 7. Эволюция доменной структуры голубых медьсодержащих оксидаз на основании данных филогенетических деревьев. Тёмно-серые прямоугольники представляют собой участки C-терминального удлинения домена (Ryden and Hunt, 1993).

Основными процессами, происходящими с предшественниками современных многодоменных оксидаз, согласно представленной гипотезе, считаются следующие:

- 1) увеличение домена (от 100 а.о. до 210 а.о.);
- 2) дубликация (удвоение) домена (от 170 а.о. до 1000 а.о.);
- 3) элонгация сегмента домена (множественная дубликация маленького фрагмента последовательности домена вплоть до 50-ти кратной);
- 4) дополнение доменов (домен, кодируемый в определённом месте генома, добавляется к исходной пептидной цепи);
- 5) формирование субъединиц (формирование многосубъединичных белков);

б) гликозилирование (присоединение углеводного фрагмента, которое в некоторых случаях обеспечивает увеличение молекулы белка в два раза).

Исходя из логики данной гипотезы, 2д лакказа могла представлять собой промежуточный 2д белок, дупликация второго домена которого и дала начало современным 3д лакказам и АО.

Однако, консервативность аминокислотных остатков, принимающих участие в связывании атомов меди у АО, лакказы и ЦП, а также общность в структуре и функционировании T2/T3-медного кластера перечисленных белков, ставит под сомнение независимость линий развития 3д оксидаз (АО и лакказа) и 6 д ЦП, которая подразумевается авторами гипотезы.

В свою очередь, основываясь на полученных данных, Murphy предположил, что рустицианин, который по структуре домена классифицируется с CuNIR, 3д МО, а также с 6д ЦП в одну группу, мог быть основоположником групп IV и V (Murphy *et al.*, 1997). А оксидазная функция могла быть впервые сформирована у CuNIR-подобного тримера (рис. 8) благодаря возникновению четырёх мутаций.

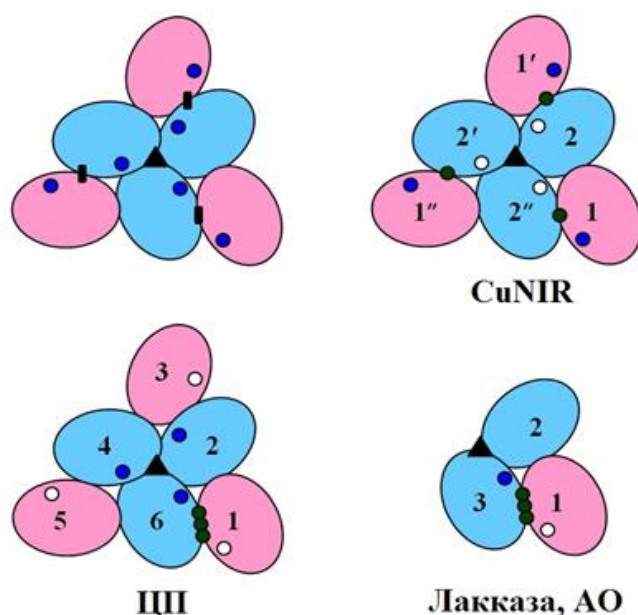


Рисунок 8. Схематическая диаграмма доменной организации лакказы, АО, ЦП и CuNIR (Murphy *et al.*, 1997). Верхняя левая диаграмма иллюстрирует вариант двойной (прямоугольники) и тройной (треугольник) симметрии шестидоменной структуры, образованной из одного КД. Домены класса IV окрашены розовым, V – голубым цветом. Синие сферы – атомы меди T1-центра, зелёные – T2/T3-медного кластера, белые – бывшей локализации атомов меди T1-центра.

Продуктом мутаций являлись восемь остатков гистидина, необходимые для оксидазной функции АО и ЦП. Далее, ЦП мог потерять два из трёх оксидазных сайтов. А потеря трёх доменов могла привести к формированию лакказоподобного 3д белка. С другой стороны, такие изменения, как дупликация/дополнение исходного лакказоподобного 3д белка, могли привести к возникновению бд ЦП. С точки зрения данной гипотезы, 2д белок, который предлагался Ryden и Hunt в качестве промежуточной формы при формировании 3д и бд МО, не мог существовать в качестве мономера и при этом быть функционально активным (при наличии T1-, T2- и T3-медных центров).

Анализ аминокислотных последовательностей, доступных в базах данных, проведенный Nakamura с коллегами, показал наличие нового типа 2д многомедных оксидаз (Nakamura *et al.*, 2003). Аминокислотные последовательности 2д ферментов содержали консервативные участки, отвечающие за связывание T1-медного центра, а также T2/T3-медного кластера, характерных для ЦП, АО и 3д лакказы, но не для CuNIR. Таким образом, было сделано предположение о том, что 2д оксидазы могли выступать в качестве промежуточной формы белка, давшего начало 3д и бд медьсодержащим оксидазам.

Nakamura и Go показали существование трёх форм 2д оксидаз (А, Б и В), основное различие между которыми заключалось в локализации T1-медного центра (Nakamura and Go, 2005). Фермент А имел сайты связывания T1-медного центра в каждом домене, фермент В имел сайты связывания T1-медного центра только во втором домене, а фермент С – только в первом домене (рис. 9).

Различия в трёх обнаруженных формах 2д ГМБ представляли линию изменения T1-медь-связывающих сайтов в направлении регрессии. Так, 2д форма А являлась более «древней» формой, так как несла сайты связывания T1-меди в обоих доменах. Формы В и С образовались из формы А путём потери сайтов связывания T1-меди первым или вторым доменами соответственно. Из данной гипотезы видно, что промежуточная 2д форма С могла быть непосредственным предшественником CuNIR (потеря формой С сайта связывания T3-медного центра). А форма В – предшественником 3д АО и лакказы (вставка одного домена с потерей сайта связывания T1-медного центра и T2/T3-кластера), а также бд ЦП (утроение формы В с потерей сайта связывания T2/T3-кластера) (рис. 9).

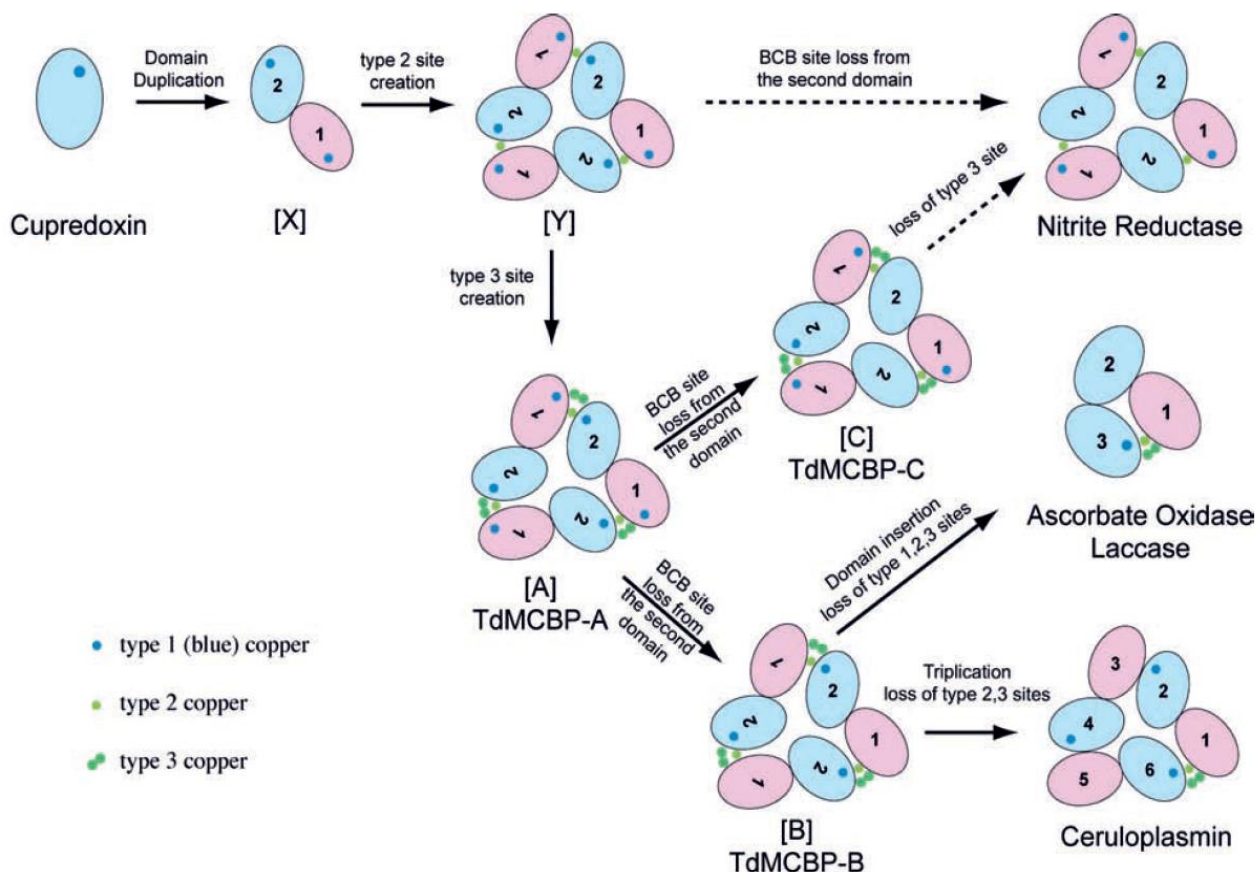


Рисунок 9. Организация доменов ГМБ. Домены класса IV окрашены розовым, V – голубым цветом. Голубые и зелёные точки – атомы меди T1- и T2/T3-медных центров, соответственно. Стрелками указаны общепринятые пути эволюции ГМБ, пунктиром – предполагаемые. Объяснение – в тексте (Nakamura and Go, 2005).

Авторами данной гипотезы были обнаружены аминокислотные последовательности, которые можно классифицировать как 2д промежуточные формы А, В и С. Охарактеризованная *para*-фенилендиамин оксидаза (PPO) из *N. europaea*, согласно анализу её аминокислотной последовательности, относится к 2д промежуточной форме фермента С. Интересным является тот факт, что PPO, как и CuNIR, представляет собой гомотример (DiSpirito *et al.*, 1985). PPO имеет ЭПР-спектр, сходный с лакказным (соотношение меди T1- и T2-центра 1:1), и плечо при 300-350 нм в спектре поглощения, что указывает на наличие T2/T3-медного кластера. В функциональном отношении PPO схожа как с CuNIR, так и с лакказой. С одной стороны, PPO, как многие лакказы, способна окислять *n*-фенилендиамин (Nagai *et al.*, 2003; Zoppellaro *et al.*, 2001). С другой стороны, подобно CuNIR, фермент катализирует восстановление нитрита. Однако данный процесс возможен только при наличии цитохрома *c*-552 в качестве донора

электрона. Удаление гена *nirK* (CuNIR) у *N. europaea* способствовало снижению продукции N_2O , однако не наблюдалось её полного отсутствия. То есть, PPO принимала участие в продукции N_2O , где имел место альтернативный путь окисления нитрита (Beaumont *et al.*, 2002). Аналогичный эксперимент по удалению гена *nirK* проводили с бактерией *Bradyrhizobium japonicum*. Выключение гена способствовало прекращению продукции N_2O (Velasco *et al.*, 2001), несмотря на наличие в геноме микроорганизма 2д формы В МГБ. То есть, 2д ГМБ В не имела нитратредуктазной активности.

2д лакказы EroA, SLAC, SilA, Ssl1, MCO и LMCO (Endo *et al.*, 2003; Machczynski *et al.*, 2004; Molina-Guijarro *et al.*, 2009; Gunne and Urlacher, 2012; Feng *et al.*, 2015; Ihssen *et al.*, 2015), согласно предложенной номенклатуре, относятся к 2д форме В МГБ. Все они представляют собой гомотримеры, подобно CuNIR. Подобно лакказе, кроме T1-медного центра, они имеют T2/T3-медный кластер, и, за исключением EroA, окисляют такие типичные субстраты лакказ, как АБТС и 2,6-диметоксифенол (2,6-ДМФ). Белок EroA, как и PPO, способен окислять N,N-диметил-*n*-фенилендиамин сульфат (ДМП).

Существование 2д ГМБ с лакказными и CuNIR свойствами свидетельствует в пользу гипотезы, предложенной Nakamura и Go (Nakamura and Go, 2005). Изначально могла произойти дупликация КД (X), а затем трипликация 2д формы белка с формированием сайтов связывания T2-медного центра (Y). Гомотримерная форма Y могла быть предшественником современным CuNIR. С другой стороны, формирование у формы Y сайтов связывания T2/T3-медного кластера привело к формированию 2д формы А ГМБ. От неё, путём исчезновения сайтов связывания T1-медного центра в первом или втором домене, и произошли 2д ГМБ с лакказной активностью (B), и с лакказной и CuNIR активностью (C). Последние, в свою очередь, могли быть предшественниками современным 3д лакказам, АО, а также 6д ЦП (рис. 9).

1. 5. Трёхдоменные лакказы базидиомицетов

1. 5. 1. Структура, клеточная локализация

Большинство лакказ базидиомицетов – мономерные. Их ММ составляет 60-70 кДа. Некоторые лакказы существуют в гомодимерной форме (Wahleithner *et al.*, 1996; Min *et al.*, 2001; Ng and Wang, 2004), описаны также гетеродимерная лакказа *Pleurotus ostreatus* (Giardina *et al.*, 2007), гомотримерная (Edens *et al.*, 1999), и гетеротримерная (Thakker *et al.*, 1992). Для лакказ базидиомицетов характерно гликозилирование. Степень гликозилирования обычно варьируется от 10 до 15%. Однако существуют лакказы и с более высоким, и с более низким

содержанием углеводного фрагмента. Например, степень гликозилирования лакказы лакказа *Pleurotus pulmonarius* составляла 44% (De Souza and Peralta, 2003), а двух изоформ фермента из штамма *Pleurotus eryngii* (лакказа I и лакказа II) – 7% и 1%, соответственно (Munoz *et al.*, 1997). В составе углеводной компоненты лакказ были обнаружены арабиноза, манноза, ксилоза, галактоза, глюкоза (Gigi *et al.*, 1981; Marbach *et al.*, 1984; Zouari *et al.*, 1987). Как правило, сахара связываются с молекулой белка через атом азота аспарагина или аргинина (N-тип гликозилирования) (Ko *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2002; Saparrat *et al.*, 2002; Lisova *et al.*, 2010). Возможное существование у лакказ O-типа гликозилирования, где сахар связывается с гидроксигруппой серина, треонина или тирозина, иногда упоминается (Perry *et al.*, 1993), но надежных доказательств этому нет.

Для некоторых базидиомицетов характерна продукция лишь одной формы лакказы. Например, гриб *Fomitopsis pinicola* продуцировал только одну лакказу с ММ 92 кДа (Park and Park, 2014), а *Phellinus linteus* – с ММ 70 кДа (Chaurasia *et al.*, 2013). Однако обычно грибы-продуценты синтезируют несколько изоформ лакказ. Изоформы (изоферменты) синтезируются в результате экспрессии разных лакказных генов. Наиболее часто бывает по 2-4 изоформы (De Souza *et al.*, 2004; Rogalski and Janusz, 2010; Martinez-Morales *et al.*, 2015), но встречаются и шесть, и десять, и более форм. Например, в геноме *Coprinopsis cinerea* было обнаружено семнадцать генов лакказы (Kilaru *et al.*, 2006), а в геноме *Flammulina velutipes* – одиннадцать (Wang *et al.*, 2015).

Кроме изоформ лакказы могут существовать и в виде множественных форм. В результате посттрансляционной модификации, включая разную степень гликозилирования, такие ферменты могут иметь различные физико-химические свойства (Calvo *et al.*, 1998). Особую сложность для изучения представляют случаи продуцирования базидиомицетами множественных форм разных изоферментов лакказы (Yaver *et al.*, 1996).

Грибные лакказы – преимущественно внеклеточные секретлируемые белки (Edens *et al.*, 1999; Lisova *et al.*, 2010). Однако лакказная активность также может быть ассоциирована с клеточной стенкой, как это показано для ферментов из штаммов *Trametes versicolor* и *P. ostreatus* (Valaskova and Baldrian, 2006; Svobodova, 2005), а также детектироваться в клеточном экстракте (Schlosser *et al.*, 1997). В последнем случае важно доказать, что активность проявляет «зрелая» лакказа, а не непротессированная форма секретлируемого фермента (как это было показано у аскомицета *Neurospora crassa*) (Froehner and Eriksson, 1974).

Как было сказано ранее, лакказы базидиомицетов классифицируют как 3д белки. T1-Центр лакказ расположен в третьем домене, а T2/T3-кластер – между первым и третьим доменами и имеет аминокислотные лиганды в каждом из них (Ducros *et al.*, 1998; Piontek *et al.*,

2002; Lyashenko *et al.*, 2006).

Наряду с типичными трёхдоменными лакказами грибов известны и необычные лакказы базидиомицетов. Так, описана «жёлтая» лакказа. Жёлтая лакказа содержит 4 атома меди в активном центре, организованных, предположительно, в три медных металлоцентра, как и у голубых лакказ. Гриб *Panus tigrinus* при твердофазном культивировании продуцировал жёлтую форму лакказы, а при погружённом – классическую голубую. Наличие необычной формы фермента вероятно связано с модификацией исходно голубой лакказы продуктами деградации лигнина (Leontievsky *et al.*, 1997). Это приводит к имитации восстановления атомов меди в активном центре: у обычных голубых лакказ, при восстановлении в анаэробных условиях, исчезали голубой максимум при 610 нм в спектре поглощения и характерный ЭПР спектр. Однако голубые лакказы в таких условиях были неактивны, и лишь при возобновлении доступа кислорода вновь появлялись спектральные характеристики и активность. Жёлтые лакказы, демонстрируя в аэробных условиях спектральные свойства восстановленных лакказ, полностью сохраняли активность. Активные лакказы грибов, не имеющие голубого максимума в спектре поглощения в аэробных условиях, были продемонстрированы и другими авторами (Schuckel *et al.*, 2011; Daroch *et al.*, 2014). Также известен случай замены ионов меди активного центра ионами других металлов в процессе биосинтеза. У гриба *P. ostreatus* были обнаружены две формы лакказы – POXA1 и POXA2, белковые части которых практически идентичны. Оба белка были активны в форме мономера и имели ММ около 60 кДа. Белок POXA2 имел максимум поглощения в голубой части видимого спектра и содержал четыре иона меди (Giardina *et al.*, 1999). Белок POXA1 – «белая» лакказа – содержал один ион меди, два иона цинка и один ион железа, не имея максимума поглощения при 600 нм (Palmieri *et al.*, 1997). Вместо этого у него наблюдался широкий максимум поглощения при 400 нм. Две формы лакказы сильно отличались в отношении рН- и термостабильности (POXA1 – более стабильный белок), однако окисляли практически одинаковый набор субстратов.

На рисунке 10 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей некоторых типичных грибных лакказ. Несмотря на общую низкую гомологию по последовательности, все белки несут консервативные медь-связывающие мотивы, представленные десятью остатками гистидина и одним остатком цистеина.

1KYA	PLITGNMGDRFQLNVIDNLNHTMLKSTS IHW HGFFQKGTNWADGPAFINQCPISSGHSF	93
2HRG	PLITGNKGRDFQLNVIDNMTNHTMLKSTS IHW HGFFQHGHTNWADGPAFVNQCPISSTGHAF	93
AEB97399.1	PLITGKTGDEFKINVINNLNHTMLKSTS IHW HGLFQRSTNWADGPAFVNQCP IATGHSF	120
AHM10329.1	PLITGKTGDRFLVDVYDDLTKNTMTTPTS IHW HGLFQHNTNWADGAASVTQCPISSGHSF	116
1A65	PLIRGGKDNFELNVVNDLNPMLRPTS IHW HGLFQRGTNWADGADGVNQCPISPGHAF	93
AAC18877.1	TLIQVNGKDSVRIPLHNKLTSPMRRSVS IHW HGFFQARTSGQDGPFSFVNQCPQPNTTF	111
	*** . * . : : : . ** .*****:** * . ** . :*** . . . :*	
1KYA	LYDFQVPDQAGTFWY HS HLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPAADLYDNDTDTVITLVDWYH	153
2HRG	LYDFQVPDQAGTFWY HS HLSTQYCDGLRGPVVYDPQDPHKSLYDVDDTSTVITLADWYH	153
AEB97399.1	LYDFQVPDQAGTFWY HS HLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPHASLYDNDTDTVITLADWYH	180
AHM10329.1	LYDFQVPDQAGTFWY HS HFLQYCDGLRGPVVYDPHDPHKLHYDVDDTSTVITLSDWYH	176
1A65	LYKFTPAGHAGTFWY HS HFGTQYCDGLRGPVIYDNDPHAAALYDEDDENTIITLADWYH	153
AAC18877.1	TYEFSVAEQSGTFWY HS HLSTQYCDGLRGAIVYDPRDPLRHLVDVDESTVITLAEWYH	171
	. . :*****: . *****. ::** .** *** *:.*.*** :***	
1KYA	VAAKLG-----PAFPLGADATLINGKGRSPSTTTADLSVISVTPGKRYRFRLVLSLSCP	207
2HRG	LAAKVG-----SPVPT-ADATLINGLGRSIDTLNADLAVITVTKGKRYRFRLVLSLSCP	206
AEB97399.1	LAAKVG-----PKFPTRSDSTLINGRGRTAATIAAELTVINVTGKRYRFRLVLSLSCP	234
AHM10329.1	VAAAS-----VPVPPESDSTLINGLGRWGGDPTAELAVITVEHGKRYRFRLVLSLSCP	229
1A65	IPAPS-----IQGAAQDSTLINGKGRYVGGPAAELSVNVEQKRYRMRLISLSCP	206
AAC18877.1	ILAPDATNEFFSSGIIPVQDSGLINGKGRFNGGPLTPFAVNVRRGKRYRLRVIAISCRP	231
	: * * : **** * : : : . * ** : * : : : * *	
1KYA	NYTFSIDGHNMTIIEETDSINTAPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEANQAVDNYWIRANPNFG-	266
2HRG	NHVFSIDGHSLTVIEADSVNLKQPOTVDSIQIFAAQRYSFVLNADQDVGNWIRALPNSG-	265
AEB97399.1	AYTFSIDGHDMTVIEADSVNTQPLEVDSIPIYTGQRYSFVVEANQPVNDNYWIRANPMAG-	293
AHM10329.1	FYTFSIDGHDMTIEADGVNTQPSKVDQLDIFAAQRYSFVLEANQPKGNWIRANPNHAN	289
1A65	NWQFSIDGHELTIEVDGELTEPHTVDRLQIFGTQRYSFVLDANQPVNDNYWIRAPNKGR	266
AAC18877.1	FFTFSVDNHSLVFMEADGVEHDPVEVQNVDIYAAQRVSVILHANQPIDNYWIRAPMTGGN	291
	**:*.*. : : : * . * * : : * : : * * * . : * * * .	
1KYA	LAINMAFNFGTN--FFINGASFTPPTVPVLLQIIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIE	381
2HRG	LALNMAFGFAGGK--FTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIE	380
AEB97399.1	KAINLAFQFDGTN--FFINGATFKPPTTPVLLQILSGAQAASDLLPSGDVHVLPSNATIE	408
AHM10329.1	VNINLELGVDVNAGLFLVNGSFFIIPDPVLLQILSGNYSAQSLPPGVVYTLPPNQSVE	406
1A65	VNLRFLQLGFSGGR--FTINGTAYESPSVPTLLQIMSGAQSANDLLPAGSVYELPRNQVVE	384
AAC18877.1	KHITLNIAPNAP--FFDINGISYISPTVPVLLQILSGAKRPEDVLPSEQIFVFPKNLSLIE	408
	: : : * : ** . : . * * . ***** : : : * * : *	
1KYA	ISFPATAAAPGAP HPFH LHGHAFAVRSAGSTVYNYDNPIFRDVVSTGTPAAGDNVTIRF	441
2HRG	ISLPATAAAPGFP HPFH LHGHTFAVRSAGSSTYNYENPVYRDVVSTGSP--GDNVTIRF	438
AEB97399.1	LSFPATIQA-GAP HPFH LHGHTFAVRSAGSTEYNYENPIFRDVVSTGVPQDNDNVTIRF	467
AHM10329.1	LSIPGGVLG--G HPFH LHGHAFSVRSAGSSVYNYKNPVLRTVTSIGDS--TDNVTIRF	462
1A65	LVPVAGVLG--G HPFH LHGHAFSVRSAGSSTYNFVNPVKRDVVSLGVT--GDEVTIRF	440
AAC18877.1	VNIPG----EG HPFH LHGHNFDVVLASNDTDFNFKNPPRRDVYPINGG----NTTFRF	459
	: . * . ***** * * * : . . : : * * * * . . . : : * * *	
1KYA	RTDNPGPWFL HCH IDF H LEAGFAVVFAEDI PDVASANPVP-----QAWSD-----	486
2HRG	RTDNPGPWFL HCH IDF H LEAGFAVVMAEDI PEVAATNPVP-----QAWSD-----	483
AEB97399.1	RTDNPGPWFL HCH IDF H LEAGFAVIMAEDT PETKSTTPCLNLGRTFALSTTRWTLVICER	527
AHM10329.1	FTDNPGPWFL HCH IDF H LNAGLAVVFAEDPKDTAFVNPVP-----SSWKE-----	507
1A65	VTDNPGPWFF HCH IEF H LMNGLAIVFAEDMANTVDANNPP-----VEWAQ-----	485
AAC18877.1	FTDNPGAWFL HCH IDW H LEAGLAIVFAEAPEDNVSGPQSQ--ITPQDWLD-----	507
	***** . * . * : : : * * * : * : : : * * : *	

Рисунок 10. Выравнивание фрагментов аминокислотных последовательностей грибных лакказ. *T. versicolor* (1KYA), *Coprinus cinereus* (1A65), *Trametes trogii* (2HRG), *Trametes sanguinea* (AEB97399.1), *Coriolopsis gallica* (AHM10329.1), *Agaricus bisporus* (AAC18877.1). Жирным шрифтом и подчёркиванием выделены консервативные медь-связывающие аминокислоты. Жирным шрифтом и курсивом выделены аксиальные лиганды T1-медного центра. Серым цветом выделены аминокислоты субстратного кармана. Звёздочки – идентичные аминокислоты, одна или две точки – гомологичные аминокислоты.

1. 5. 2. Субстраты и ингибиторы

Лакказы окисляют большой перечень субстратов, которые подразделяются на две группы: доноры электрона (АБТС, ферроцианид), и доноры электрона и протона (фенолы и амины). Типичными субстратами лакказ, характерными для большинства известных лакказ различного происхождения, являются АБТС, сингальдазин (СГЗ), катехол (2-гидроксифенол), 2,6-диметоксифенол, гваякол (2-метоксифенол), *n*-фенилендиамин. Лакказы не способны окислять тирозин. АБТС и сингальдазин принято считать тестовыми субстратами лакказ, т.к. эти субстраты окисляются всеми лакказами, причем, наиболее эффективно (низкие значения константы Михаэлиса (K_m) и высокие числа оборотов ферментов (k_{cat})), – в сравнении с другими типичными лакказными субстратами, – 2,6-ДМФ и гваяколом (высокие величины K_m и низкие k_{cat}) (Nitheranont *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012a; Chaurasia *et al.*, 2013). Единичные примеры неспособности лакказ окислять сингальдазин являлись следствием продукции ферментов в гетерологичной системе, тогда как нативные лакказы были способны окислять сингальдазин (Hilden *et al.*, 2013; An *et al.*, 2015).

Большинство лакказ окисляют *орто*-, *мета*- и *пара*-замещённые фенольные соединения (Baldrian, 2006). *о*-Замещённые соединения: гваякол, катехол, кофейная кислота, пирогаллол, галловая кислота, протокатехиновая кислота и др. *п*-Замещённые соединения: гидрохинон, *п*-крезол и др. *м*-Замещённые соединения: *м*-фенилендиамин, орцинол, резорцинол и др. *о*-Замещённые соединения окисляются лакказами с более высокой скоростью, чем *м*- и *п*-замещённые (Blaich and Esser, 1975; Thakker *et al.*, 1992). Лакказы окисляют лигнаны (димеры фенилпропана растительного происхождения), норлигнаны (дифенилпентаны растительного происхождения), олиголигнолы (продукты разложения лигнина полифенольного характера), флобатаннины (негидролизуемые танины древесины), гидролизуемые и частично гидролизуемые дубильные вещества (галлотаннины и эллагитаннины), а также *о*- и *п*-аминофенолы, ароматические *о*- и *п*-диамины. Также лакказы способны окислять неорганические соединения: Mn^{2+} (Hofer and Schlosser, 1999), ферроцианид (Морозова *и др.*, 2007), йодид (Seki *et al.*, 2012).

Разные лакказы могут окислять разный набор субстратов, а также окислять одни и те же субстраты с разной скоростью. Вероятно, это связано с вариабельностью аминокислотных остатков, ответственных за связывание субстрата в субстратных карманах различных лакказ (Xu *et al.*, 1998) (рис. 10).

Ингибиторы лакказ – органические и неорганические соединения (Yaropolov *et al.*, 1994; Xu, 1996). Небольшие неорганические анионы, такие как галогениды (за исключением йодида

(Xu, 1996)), азид-, фторид-анионы, связываются с T2/T3-центром лакказ, препятствуя передаче электрона от T1-центра на T2/T3- кластер и ингибируя активность (Xu, 1996; Gianfreda *et al.*, 1999). Высокая концентрация гидроксид-анионов в щелочной среде также ингибирует активность лакказ. Это связано с тем, что кислород восстанавливается на трёхъядерном T2/T3-кластере до гидроксил-ионов, а не до воды, как в кислой среде. OH-Анионы прочно связываются с ионами меди и происходит снижение скорости внутримолекулярного переноса электрона от T1-центра к T2/T3-кластеру. При определённом высоком значении pH фермент становится неактивным (Xu, 1996). Ионы металлов могут оказывать как ингибирующий, так и активирующий эффект на активность лакказы. Так, ионы Cu^{2+} , обычно повышающие активность лакказ грибов (например, активность лакказы *Lentinula edodes* (Nagai *et al.*, 2002)), ингибировали лакказу *Chaetomium thermophile* (Ishigami *et al.*, 1988). Ионы Fe^{2+} и Hg^{2+} оказывали, преимущественно, ингибирующий эффект (Baldrian, 2006). ЭДТА, являющаяся хелатирующим агентом, также способствовала снижению активности лакказы. Это происходит за счёт связывания катионов активного центра лакказы (Ben Younes *et al.*, 2007; Forootanfar *et al.*, 2011; Daassi *et al.*, 2013). Такие соединения, как дитиотреитол, тиогликолевая кислота, цистеин и диэтилдитиокарбаминовая кислота, также являются ингибиторами лакказ (Palmieri *et al.*, 1997; Heinzkill *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2007; Kumar and Srikumar, 2012; Bao *et al.*, 2013).

Азид-ион является истинным ингибитором лакказы (в отношении субстратов АБТС и 2,6-диметксифенола), в отличие от цистеина, меркаптоуксусной кислоты, диэтилдитиокарбаминовой кислоты или дитиотреитола. Перечисленные соединения не ингибируют лакказную активность, а восстанавливают продукт ферментативной реакции (АБТС+ и хинон) (Johannes and Majcherczyk, 2000).

1. 5. 3. Физико-химические свойства

Оптимум pH для грибных лакказ при использовании в качестве субстратов органических соединений (2,6-ДМФ, гваякол, гидрохинон, катехол, и др. фенолы, сингальдазин), обычно находится в интервале 4,0-7,0. Оптимум pH для окисления АБТС находится в кислой области (>4,0). Для гидрохинона и катехола оптимальным значением pH является обычно 3,5 и 6,2, соответственно (Kumari and Sirsi, 1972; Shleev *et al.*, 2004). Для фенольных субстратов, как доноров электрона и протона, с повышением значения pH среды потенциал ионизации постепенно снижается в результате формирования фенолят-ионов, что приводит к увеличению скорости окисления последних. С повышением величины pH также происходит ингибирование лакказы OH-анионами, прочно связывающимися с атомами меди в T2/T3-кластере фермента.

Таким образом, за счёт влияния двух противоположно направленных эффектов, кривая окисления лакказами фенольных субстратов приобретает колоколообразную форму (Xu *et al.*, 1997). Если рассматривать нефенольные субстраты (доноры только электрона), то изменение рН среды не влияет на потенциал их ионизации. И в данном случае зависимость окисления данного типа субстратов от значения рН среды будет определяться только одним эффектом (ингибирование ОН-анионами) и иметь форму нисходящей кривой (Fukushima and Kirk, 1995; Baldrian, 2004; Quarantino *et al.*, 2007; Wahleithner *et al.*, 1996; Shleev *et al.*, 2005). Стоит отметить, что с изменением значений рН среды от 2,7 до 11,0 практически не наблюдается изменения окислительно-восстановительного потенциала лакказ.

Грибные лакказы более стабильны при нейтральных значениях рН (Levasseur *et al.*, 2010; Zhao, *et al.*, 2012). Так, лакказы из штаммов *Pycnoporus sanguineus* BRFM 66 и BRFM 902, а также *Pycnoporus coccineus* BRFM 938 были более стабильны при значениях рН 5,0-7,0, 6,0-7,0 и 7,0 соответственно (Uzan *et al.*, 2010). Известны отдельные примеры лакказ грибов, более стабильных при щелочных значениях рН (Daassi *et al.*, 2013), например, Lcc9 из *C. cinerea* при значении рН 8,5 (Pan *et al.*, 2014).

Температурный оптимум типичных грибных лакказ составляет 40-60°C. Однако существуют лакказы с более низким (25°C для лакказы *G. lucidum* (Ko *et al.*, 2001)), или более высоким значением оптимума ($\geq 80^\circ\text{C}$ для лакказы *Marasmius quercophilus* (Farnet *et al.*, 2000)).

Для определения характеристик термоинактивации лакказ не разработано общепринятых условий. Время полуинактивации фермента при 50°C может составлять 2-3 ч (лакказы *Lentinus edodes* и *A. bisporus* (Wood, 1980; D'Annibale, 1996)), или же 50–70 ч (лакказа *Trametes* sp. (Смирнов *и др.*, 2001)).

1. 5. 4. Функции

Существует несколько функций, описанных для грибных лакказ: участие в морфогенезе, деградации лигнина, патогенезе, а также детоксификация опасных для организма-продуцента соединений.

Деградация лигнина. Лакказы способны непосредственно окислять лишь фенольные подструктуры полимерного лигнина, на долю которых приходится не более 20% полимерного лигнина, а также фенольные мономеры, димеры и олигомерные фрагменты лигнина. А в паре с природными медиаторами лакказы грибов окисляют и нефенольные лигниновые субстраты (нефенольные подструктуры полимерного лигнина, вератриловый спирт, гомовератровую кислоту и др.). Природными медиаторами являются как продукты деполимеризации и

окисления лигнина (ванилин, ацетосирингон, альдегид сиреневой кислоты, *n*-кумаровая кислота (Camarero *et al.*, 2005; Gutierrez *et al.*, 2007)), так и внеклеточные метаболиты грибов (3-гидроксиантралиловая кислота, 4-гидроксибензойная кислота, 4-гидроксибензиловый спирт (Eggert *et al.*, 1996; Johannes and Majcherczyk, 2000)), секретлируемые в период проявления лигнинолитической активности. Особое значение для деструкции лигнина имеет способность некоторых лакказ грибов окислять Mn^{2+} до Mn^{3+} . Ион Mn^{3+} способен окислять нефенольные структуры лигнина, недоступные лакказе, однако нестабилен в водной среде. Лигнинолитические грибы продуцируют ряд органических кислот (щавелевая, молочная и др.), способных хелатировать Mn^{3+} и, т.о., стабилизировать комплекс Mn^{3+} -хелатор, способный окислять устойчивые нефенольные подструктуры лигнина (Perez and Jeffries, 1992; Banci *et al.*, 1998).

Детоксификация. Одна из функций грибных лакказ – детоксификация продуктов разложения лигнина и других токсичных соединений. Все ферменты, участвующие в разложении лигнина, обладают высокой окислительной способностью и в процессе разложения лигнина производят реакционноспособные соединения (2,5-ксилидин, 1-гидроксибензотриазол и др.), которые могут оказать токсическое воздействие на живые организмы. Лакказа может полимеризовать такие высокоактивные соединения и переводить их, таким образом, в нерастворимые полимеры, прежде, чем они смогут нанести вред грибному мицелию (Thurston, 1994; Collins and Dobson, 1997).

Морфогенез. У многих грибов лакказная активность сопряжена с синтезом внеклеточных пигментов. Пигменты выступают связующими элементами при сшивке компонентов клеточных стенок грибов. Таким образом, формирование плотного плодового тела гриба напрямую зависит от функционирования лакказы. Так, мутантный гриб *Pleurotus florida* с низкой продукцией лакказы не формировал плодовых тел. Также для него наблюдалась низкая скорость роста мицелия. Однако у ревертанта наблюдалось восстановление исходной скорости роста мицелия, и он формировал плодовые тела (Das *et al.*, 1997). Лакказы участвуют в формировании ризоморфов (прочные сплетения гиф гриба), синтезируя, предположительно, полифенолы, склеивающие клеточные стенки гиф (Thurston, 1994). Кроме того, формирование меланиноподобных материалов в клеточных стенках с участием лакказы, защищает гифы и конидии грибов от ультрафиолетового излучения (Henson *et al.*, 1999).

Патогенез. Лакказа является патогенным фактором во многих заболеваниях, вызываемых грибами. Лакказа защищает гриб-патоген от действия токсичных фитоалексинов и танинов (Pezet *et al.*, 1992). Фитоалексины и танины останавливают рост конидий патогена, могут вызывать разрыв плазматической мембраны, ингибировать некоторые АТФ-азы и

индуцировать диссоциацию шаперонов, влияя на структуру цитоскелета и вызывая гибель апикальных клеток гриба (Jeandet *et al.*, 2002). Известный пример фитопатогенного гриба – *Botrytis cinerea*, вызывает гниение многих культур (морковь, огурцы, виноград). В процессе патогенеза *B. cinerea* происходит продукция и секреция лакказы, способной окислять фитоалексины. В свою очередь, защитные механизмы растения направлены на снижение уровня секреции лакказы (Viterbo *et al.*, 1993). Лакказа также является фактором вирулентности у гриба *Cryptococcus neoformans*, вызывающего заболевания у людей (Williamson, 1994, 1997). Лакказа *C. neoformans* обеспечивала синтез меланина, и способствовала распространению инфекции в центральной нервной системе. Удаление гена лакказы у вирулентного штамма приводило к снижению распространения гриба по центральной нервной системе, снижению лёгочной эозинофилии, повышению уровня Т-клеток и повышению уровня цитокинов (Qiu *et al.*, 2012).

1. 5. 5. Способы получения: индукция, экспрессия

Грибные лакказы – индуцибельные ферменты, обычно секретируемые во внеклеточное пространство. У отдельных грибов может наблюдаться и незначительный конститутивный синтез фермента. При культивировании грибов-продуцентов индукция синтеза лакказы происходит при внесении индуктора, независимо от того, в какой фазе роста находится продуцент.

Индукторами синтеза лакказ в большинстве случаев являются ионы меди, фенольные соединения (гваякол, 2,6-ДМФ, галловая кислота и др.), нефенольные ароматические соединения (метилбензиловые спирты, 3,4-диметоксибензиловый спирт и др.), препараты лигнина и лигнин-содержащие материалы и др. соединения (этанол, изопропанол, флавоноиды) (Masaphy and Levanon, 1992; Palmieri *et al.*, 2003; Quaratino *et al.*, 2007; Lisova *et al.*, 2010; Coman *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2014).

Для получения лакказ из природных штаммов грибы обычно культивируют в жидкой среде (погруженное и глубинное культивирование), в том числе с фиксацией мицелия на твёрдой подложке (металлическая или полимерная сетка, поликапроамидное волокно, пенополиуретан и т.п.), для имитации физических условий обитания дереворазрушающих грибов в природе (Prasad *et al.*, 2005; Silverio *et al.*, 2013). При культивировании грибов на жидкой среде, кроме вышеназванных индукторов и их комбинаций, нередко используют дешёвые природные лигноцеллюлозные материалы, например, сено, солому, пшеничные отруби (Fokina *et al.*, 2016). Кроме обычной оптимизации условий роста грибов в жидкой среде

(аэрация, температура, рН, концентрация и время внесения индуктора) применяют еще сдвиг температуры или скорости перемешивания (Leontievsky *et al.*, 1994).

При твердофазном культивировании в качестве ростового материала используют лигноцеллюлозные материалы (солома, опилки, стружка, щепа, жмых и т.п.) также имитирующие условия обитания грибов в природе (Couto and Sanroman, 2005). Разновидностью такого способа культивирования можно считать выращивание мицелия гриба на пенополиуретане, пропитанном средой для культивирования (Tellez-Jurado *et al.*, 2006).

В последние годы для повышения выхода лакказы часто используют методы молекулярной биологии, например, повышение уровня экспрессии гена лакказы. Экспрессия в гетерологичной системе лучше подходит для масштабного производства лакказ, т.к. возможно осуществление экспрессии генов лакказ из разных источников в одной экспрессионной системе. Гены лакказ грибов сложно экспрессировать не в грибном продуценте (Kunamneni *et al.*, 2008a; Nishibori *et al.*, 2013). Использование бактерий в качестве штамма-продуцента лакказ грибов невозможно, прежде всего, из-за отсутствия у бактериальных продуцентов более сложных генетических и метаболических систем для созревания активного эукариотического белка (необходимость сплайсинга мРНК, гликозилирования, наличия определённых белков-шаперонов и т.д.) и его секреции. Экспрессия лакказ в гетерологичной системе была продемонстрирована, главным образом, у мицелиальных грибов (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae* и *Trichoderma reesei*) (Hoshida *et al.*, 2005; Bohlin *et al.*, 2006), а также у дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia methalonica*, *Yarrowia lipolytica* и *Kluyveromyces lactis*) (Kunamneni *et al.*, 2008b; Yang *et al.*, 2015). Существуют примеры экспрессии в гомологичной системе, где грибы-базидиомицеты *Pycnoporus cinabarinus* и *Coriolus versicolor* были использованы в качестве штамма-продуцента лакказы (Alves *et al.*, 2004; Kajita *et al.*, 2004).

1. 6. Бактериальные лакказы

Бактериальные лакказы были обнаружены у многих представителей эубактерий, а также у некоторых представителей архебактерий (Claus, 2003). Т.к. наличие лакказ у бактерий было обнаружено сравнительно недавно (Alexandre and Zhulin, 2000), эта группа ферментов еще довольно плохо изучена. В структурном отношении лакказы бактерий подразделяются на 2д и 3д ферменты.

1. 6. 1. Бактериальные 3д лакказы

1. 6. 1. 1. Структура, клеточная локализация

В настоящее время охарактеризовано около пятидесяти 3д бактериальных лакказ. ММ 3д ферментов обычно варьируется в пределах 50-70 кДа. Однако существуют ферменты и с другими значениями ММ, например, ММ у лакказы *γ-proteobacterium* JB была равной 120 кДа (Singh *et al.*, 2007). Преимущественно, 3д лакказы – мономерные белки. Однако некоторые лакказы описаны в форме гомодимера (Tamaki *et al.*, 2010) или даже в мультимерной форме (Diamantidis *et al.*, 2000). Некоторые 3д лакказы бактерий были описаны как гликопротеины. Углеводные фрагменты были обнаружены у лакказы LccA из *Haloferax volcanii* (Uthandi *et al.*, 2010), у ферментов из *Streptomyces psammoticus* MTCC 7334 (Niladevi *et al.*, 2008), и *Bacillus licheniformis* (Lu *et al.*, 2013). Стоит обратить внимание на то, что большинство охарактеризованных 3д лакказ были экспрессированы в гетерологичной системе (в различных штаммах *E. coli*). И для полученных рекомбинантных белков гликозилирование было не характерно. Известные примеры гликозилированных ферментов экспрессированы либо непосредственно штаммом-носителем гена (лакказа *S. psammoticus*), либо получены в результате экспрессии в гомологичной системе (лакказа *Haloferax volcanii*), либо экспрессированы в эукариотической экспрессионной системе (лакказа из *B. licheniformis*) (табл. 1). Таким образом, есть вероятность, что гликозилирование более широко распространено у 3д лакказ, чем это принято считать. Использование *E. coli* для экспрессии лакказ не обеспечивает должного гликозилирования продуцируемых белков из-за отсутствия соответствующих ферментных систем у штамма-продуцента.

Структурная организация 3д лакказ бактериального происхождения аналогична таковой грибных 3д лакказ (п. 1.4). Ниже представлена организация активного центра бактериальной лакказы CotA из штамма *Bacillus subtilis* (рис. 11). У 3д бактериальных лакказ атомы меди также координированы десятью аминокислотными остатками гистидина и одним остатком цистеина, как и у 3д грибных и 2д бактериальных лакказ. Спектр поглощения аналогичен спектру поглощения грибных лакказ (присутствует пик поглощения при 610 нм, и плечо при 330 нм).

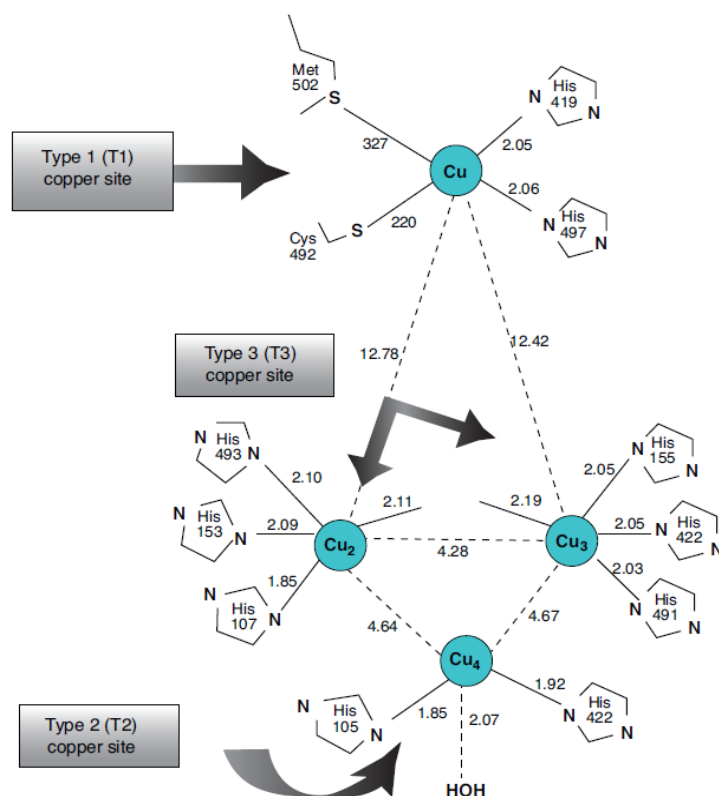


Рисунок 11. Структурная организация активного центра 3д бактериальной лакказы CotA из штамма *B. subtilis* (Santhanam *et al.*, 2011).

Анализ аминокислотных последовательностей у охарактеризованных 3д бактериальных лакказ указывает на их общую низкую гомологию и низкую гомологию с грибными 3д лакказами. Однако бактериальные 3д лакказы, выделенные из разных представителей в пределах одного рода, показывают высокую гомологию по аминокислотной последовательности (табл. 2).

Среди 3д бактериальных лакказ встречаются ферменты как с сигнальным пептидом, так и без него (табл. 3). Примечательно, что практически все охарактеризованные лакказы из представителей рода *Bacillus*, не имеют сигнального пептида. Вероятно, это связано с тем, что фермент ассоциирован со споровой оболочкой. Исключение составляет лакказа Lbh1 *B. halodurans* (Ruijssenaars and Hartmans, 2004).

Таблица 1.

Физико-химические и кинетические характеристики 3д бактериальных лакказ.

Источник	ММ, кДа	Продукция	Температурный оптимум	pH-оптимум	pI	pH-стабильность	K_m и k_{cat} ферментов	Ссылки
<i>Aeromonas hydrophila</i> WL-11	59 – ДДС (58,5)*	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	н/и	АБТС – 2,6; 2,6-ДМФ – 8,0	(6,26)	н/и	АБТС: $K_m = 0,94$ мМ, $k_{cat} = 81,98$ с ⁻¹ 2,6-ДМФ: $K_m = 1,83$ мМ, $k_{cat} = 205,99$ с ⁻¹	(Wu <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aquifex aeolicus</i>	57 – ДДС (59,5)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	75°C	АБТС – 4,0; СГЗ – 7,0;	4,12 (5,33)	н/и	АБТС: $K_m = 128 \pm 8$ мкМ СГЗ: $K_m = 38$ мкМ	(Fernandes <i>et al.</i> , 2007)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	40 – ДДС, 130 – Н	Внутриклеточная	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	(Herter <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus subtilis</i>	65 – ДДС 53 – ГФ	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	75°C	АБТС $\leq 3,0$; СГЗ – 7,0	7,7 (5,9)	н/и	АБТС: $K_m = 106 \pm 11$ мкМ, $k_{cat} = 16,8 \pm 0,8$ с ⁻¹ СГЗ: $K_m = 26 \pm 2$ мкМ, $k_{cat} = 3,7 \pm 0,1$ с ⁻¹	(Martins <i>et al.</i> , 2002)
<i>Bacillus vallismortis</i> fmb-103	н/о	Ассоциирована с оболочкой спор	85°C	АБТС – 4,4; СГЗ – 8,4	н/и	3,0-7,0	н/и	(Zhang <i>et al.</i> , 2012)
γ -proteobacterium JB	120 – ДДС 125 – ГФ	Внутриклеточная	55°C	СГЗ – 6,0; Гваякол – 6,5	н/и	4,0-7,0	СГЗ: $K_m = 0,01$ мМ Гваякол: $K_m = 0,58$ мМ	(Singh <i>et al.</i> , 2007)
<i>Haloferax volcanii</i> (apx.)	80 – ДДС (60,1) ГП	Внеклеточная в <i>Haloferax volcanii</i>	45-50°C	АБТС – 6,0; СГЗ – 8,4	(4,34)	н/и	АБТС: $K_m = 700$ мкМ, $k_{cat} = 10$ с ⁻¹ СГЗ: $K_m = 67$ мкМ, $k_{cat} = 19,4$ с ⁻¹	(Uthandi <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	65 – ДДС	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	85°C	АБТС – 4,2; СГЗ – 7,0; 2,6-ДМФ – 7,0	7,0	н/и	АБТС: $K_m = 6,5 \pm 0,2$ мкМ, $k_{cat} = 83$ с ⁻¹ СГЗ: $K_m = 4,3 \pm 0,2$ мкМ, $k_{cat} = 100$ с ⁻¹ 2,6-ДМФ: $K_m = 56,7$ мкМ, $k_{cat} = 28$ с ⁻¹	(Koschorreck <i>et al.</i> , 2008)
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	53 – ДДС (~49)	Внутриклеточная, внутриклеточная в <i>E. coli</i>	92°C	АБТС – 4,5; СГЗ – 5,5	>10 (7,18)	н/и	АБТС: $K_m = 0,9$ мМ, $k_{cat} = 24,6$ с ⁻¹ СГЗ: $K_m = 1,88$ мМ, $k_{cat} = 6,47$ с ⁻¹	(Miyazaki, 2005)
<i>Ochrobactrum</i> sp. 531	60 – ДДС (57,8)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	37-40°C	АБТС – 3,6; СГЗ – 7,5; 2,6-ДМФ – 8,0	(5,58)	6,5-7,5	АБТС: $K_m = 72$ мкМ, $k_{cat} = 2,95$ с ⁻¹ СГЗ: $K_m = 15$ мкМ, $k_{cat} = 2,4$ с ⁻¹ 2,6-ДМФ: $K_m = 90$ мкМ, $k_{cat} = 7,94$ с ⁻¹	(Li <i>et al.</i> , 2012)
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	55 – ДДС	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	н/и	АБТС – 4,0; СГЗ – 7,0; 2,6-ДМФ – 8,0-8,5	н/и	7,6-9,0	2,6-ДМФ: $K_m = 1,02$ мМ, $k_{cat} = 1$ с ⁻¹ (pH 6,0), $k_{cat} = 6$ с ⁻¹ (pH 8,0)	(Brander <i>et al.</i> , 2014)
<i>Bacillus</i> sp. HR03	65 – ДДС	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	н/и	АБТС – 4,0; СГЗ – 7,0; 2,6-ДМФ – 7,4	н/и	н/о	АБТС: $K_m = 535$ мкМ, $k_{cat} = 127$ с ⁻¹ СГЗ: $K_m = 5$ мкМ, $k_{cat} = 20$ с ⁻¹ 2,6-ДМФ: $K_m = 53$ мкМ, $k_{cat} = 3$ с ⁻¹	(Mohammadi <i>et al.</i> , 2010)
<i>Stenotrophomo-</i>	н/о	Внутриклеточная	40°C	СГЗ – 7,0	н/и	6,0-9,0	АБТС: $K_m = 700$ мкМ	(Galai <i>et al.</i> ,

<i>nas maltophilia</i> AAP56							СГЗ: $K_m - 53 \text{ мкМ}$ Пирокатехол: $K_m - 25 \text{ мкМ}$	2008)
<i>Streptomyces cyaneus</i> CECT 3335	75 – ДДС	Внеклеточная	70°C	АБТС – 4,5	5,6	5,0-8,0	АБТС: $K_m - 380 \text{ мкМ}$	(Arias <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptomyces lavendulae</i> REN-7	73 – ДДС (68,7)	Внутриклеточная; внеклеточная в <i>E. coli</i>	50°C	Катехол – 4,5	н/и	7,0-10,5	Катехол: $K_m - 43 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 10,9 \text{ с}^{-1}$ Гидрохинон: $K_m - 39 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 5,3 \text{ с}^{-1}$ Гваякол: $K_m - 58 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 1,6 \text{ с}^{-1}$	(Suzuki <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptomyces psammoticus</i> MTCC 7334	43 – ДДС ГП	Внеклеточная	45°C	АБТС – 8,5	7,9	6,5-9,5	АБТС: $K_m - 390 \text{ мкМ}$ Пирогаллол: $K_m - 250 \text{ мкМ}$ СГЗ: $K_m - 3,35 \text{ мМ}$	(Niladevi <i>et al.</i> , 2008)
<i>Bacillus pumilus</i> DSM 27	58 – ДДС (58,6)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	70°C	АБТС – 4,0; СГЗ – 6,5; 2,6-ДМФ – 7,0	н/и	н/и	АБТС: $K_m - 80 \pm 4 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 291 \pm 2,7 \text{ с}^{-1}$ СГЗ: $k_{cat} - 66 \pm 1,5 \text{ с}^{-1}$ 2,6-ДМФ: $K_m - 680 \pm 27 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 11 \pm 0,1 \text{ с}^{-1}$	(Reiss <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus halodurans</i> HHR028	56 – ДДС (56,1)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	45°C	СГЗ – 7,5-8,0	н/и	н/и	н/и	(Ruijsenaars and Hartmans, 2004)
<i>Bacillus</i> sp. ADR	66 – ДДС	Внеклеточная	40°C	2,6-ДМФ – 4,0; Гваякол – 5,0; о-толуидин – 3,0	н/и	7,0-9,0	н/и	(Telke <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LC02	н/и	Ассоциирована с оболочкой спор	70°C	СГЗ – 6,6	н/и	н/и	н/и	(Pan <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus sphaericus</i>	н/и	Ассоциирована с оболочкой спор	60°C	СГЗ – 6,0; 2,6-ДМФ – 6,0	н/и	н/и	н/и	(Claus and Filip, 1997)
<i>Bacillus</i> SF	н/и	Ассоциирована с оболочкой спор	н/и	н/и	н/и	5,0-9,5	н/и	(Held <i>et al.</i> , 2005)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	81,5; 16,3 – ДДС	Внутриклеточная	30°C	СГЗ – 6,0	н/и	н/и	СГЗ: $K_m - 34,65 \text{ мкМ}$	(Diamantidis <i>et al.</i> , 2000)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> CE52G	95 – ДДС	Внутриклеточная	н/и	АБТС – 5,0; СГЗ – 5,0	н/и	н/и	СГЗ: $K_m - 4,0 \text{ мкМ}$	(Castro-Sowinski <i>et al.</i> , 2002)
Bovine rumen microflora RL5	~57 – Н ~57 – ГФ (28,282)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	60°C	СГЗ – 4,0-5,0; АБТС – 4,5; 2,6-ДМФ – 4,5	(5,29)	3,5 и 9,5	АБТС: $K_m - 26 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 18 \text{ с}^{-1}$ СГЗ: $K_m - 0,43 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 660 \text{ с}^{-1}$ 2,6-ДМФ: $K_m - 0,45 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 1175 \text{ с}^{-1}$	(Beloqui <i>et al.</i> , 2006)
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> (арх.)	~52 – ДДС 49,6 – ГФ (52,9)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	85°C	АБТС – 3,0; СГЗ – 7,0	н/и	н/и	АБТС: $K_m - 133 \pm 8 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 72 \pm 6 \text{ мин}^{-1}$ СГЗ: $K_m - 14 \pm 5 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 24 \pm 0 \text{ мин}^{-1}$	(Fernandes <i>et al.</i> , 2010)

<i>Pseudomonas desmolyticum</i> NCIM 2112	43 – ДДС	Внутриклеточная	60°C	АБТС – 4,0; Гидрохинон – 4,0	н/и	н/и	н/и	(Kalme <i>et al.</i> , 2009)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	~59 – ДДС	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	60°C	н/и	н/и	7,5	АБТС: $K_m - 2,15$ мМ, $k_{cat} - 96,4$ мин ⁻¹ СГЗ: $K_m - 0,11$ мМ, $k_{cat} - 13,2$ мин ⁻¹ 2,6-ДМФ: $K_m - 3,5$ мМ, $k_{cat} - 115,2$ мин ⁻¹	(Ricklefs <i>et al.</i> , 2014)
<i>Bacillus subtilis</i> WPI	55 – ДДС 55 – Н	Внутриклеточная	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	(Sheikhi <i>et al.</i> , 2012)
<i>Bacillus subtilis</i> X1	~65 – ДДС	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	60°C	АБТС – 4,4; СГЗ – 6,9; 2,6-ДМФ – 7,3	н/и	7,0-9,0	н/и	(Guan <i>et al.</i> , 2014)
<i>Bacillus licheniformis</i> LS04	65 – ДДС 71 – ГФ (59,07) ГП	Внеклеточная в <i>P. pastoris</i>	70°C	АБТС – 4,2; СГЗ – 6,2; 2,6-ДМФ – 6,6	н/и	7,0-9,0	АБТС: $K_m - 44,0$ мкМ, $k_{cat} - 5,6$ с ⁻¹ СГЗ: $K_m - 4,1$ мкМ, $k_{cat} - 3,3$ с ⁻¹ 2,6-ДМФ: $K_m - 57,5$ мкМ, $k_{cat} - 1,4$ с ⁻¹	(Lu <i>et al.</i> , 2013)
<i>Bacillus licheniformis</i> LS04	н/и	Ассоциирована с оболочкой спор	60°C	АБТС – 4,2; СГЗ – 6,6; 2,6-ДМФ – 7,4	н/и	7,0-9,0	н/и	(Lu <i>et al.</i> , 2012)
<i>Echerihia coli</i> AKL2	~50 – ДДС	Внеклеточная	50°C	СГЗ – 8,5	н/и	н/и	СГЗ: $K_m - 4,0$ мМ (50°C), $K_m - 5,63$ мМ (80°C)	(Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2013)
Морской метагеном	49 – ДДС (47,860)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	45°C	СГЗ – 7,5	н/и	7,0	АБТС: $K_m - 123$ мкМ СГЗ: $K_m - 4,5$ мкМ	(Fang <i>et al.</i> , 2011)
Морской метагеном	50 – ДДС (52,023)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	45°C	СГЗ – 7,5; 2,6-ДМФ – 8,0; Катехол – 7,0; L-дофамин – 7,5; $K_4Fe(CN)_6 - 6,5$	н/и	6,0-8,0	СГЗ: $K_m - 12,2$ мкМ, $k_{cat} - 15,41$ с ⁻¹ 2,6-ДМФ: $K_m - 216$ мкМ, $k_{cat} - 17,83$ с ⁻¹ $K_4Fe(CN)_6$: $K_m - 381$ мкМ, $k_{cat} - 320,98$ с ⁻¹	(Fang <i>et al.</i> , 2012)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	н/и	Ассоциирована с оболочкой спор, в <i>B. subtilis</i> DB104	80°C	АБТС – 4,0	н/и	н/и	АБТС: $K_m - 443 \pm 124$ мкМ	(Cho <i>et al.</i> , 2011)
<i>Lysobacter</i> sp. T-15	67 – ДДС ~132 – Н (64,555)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	н/и	АБТС – 4,8-5,2; Билирубин – 6,6-7,0; Урат – 6,6-6,9	5,2	н/и	АБТС: $K_m - 2,8$ мМ Билирубин: $K_m - 15$ мкМ Урат: $K_m - 0,36$ мМ	(Tamaki <i>et al.</i> , 2010)
Метагеном мангровых почв	75 – ДДС (75,4)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	55°C	Гваякол – 7,5	н/о	7,0-10,0	АБТС: $K_m - 90$ мкМ, $k_{cat} - 0,042$ с ⁻¹ СГЗ: $K_m - 8$ мкМ, $k_{cat} - 0,031$ с ⁻¹ 2,6-ДМФ: $K_m - 340$ мкМ, $k_{cat} - 96,25$ с ⁻¹	(Ye <i>et al.</i> , 2010)
<i>Thermus thermophilus</i> SG0.5JP17-16	53 – ДДС (53)	Внеклеточная в <i>P. pastoris</i>	90°C	АБТС – 4,5; СГЗ – 6,0; 2,6-ДМФ – 8,0;	(8,82)	4,0-11,0	АБТС: $K_m - 36,0 \pm 3,4$ мкМ, $k_{cat} - 0,365 \pm 0,012$ с ⁻¹ СГЗ: $K_m - 27,0 \pm 1,5$ мкМ,	(Liu <i>et al.</i> , 2015)

				Гваякол – 7,5			$k_{cat} - 1,001 \pm 0,061 \text{ c}^{-1}$ 2,6-ДМФ: $K_m - 152,1 \pm 13,8 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 0,13 \pm 0,012 \text{ c}^{-1}$ Гваякол: $K_m - 363,3 \pm 29,1 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 4,345 \pm 0,216 \text{ c}^{-1}$	
<i>Bacillus</i> sp. SL-1	65 – ДДС	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	50°C	АБТС – 4,5; СГЗ – 6,5	н/и	6,5 и 8,5	АБТС: $K_m - 46 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 23 \text{ c}^{-1}$ СГЗ: $K_m - 19,6 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 24 \text{ c}^{-1}$	(Safary <i>et al.</i> , 2016)
<i>Thioalkalivibrio</i> sp. ALRh	60 – ДДС	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	50°C	АБТС – 5,0; 2,6-ДМФ – 9,5	(5,6)	2,1-9,9	АБТС: $K_m - 4,6 \pm 1,1 \text{ мМ}$, $k_{cat} - 2,158 \pm 0,156 \text{ c}^{-1}$ 2,6-ДМФ: $K_m - 4,0 \pm 1,8 \text{ мМ}$, $k_{cat} - 0,015 \pm 0,002 \text{ c}^{-1}$	(Ausec <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pantoea</i> <i>ananatis</i> Sd-1	120 – ДДС (58,1)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	н/и	АБТС – 2,5; Гваякол – 4,5	(6,3)	1,0-3,0	АБТС: $K_m - 1,03 \pm 0,154 \text{ мМ}$ Гваякол: $K_m - 6,1 \pm 1,7 \text{ мМ}$	(Shi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Thermus</i> <i>thermophilus</i> HJ6	27 – ДДС ГФ – 25 (26,2)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	75°C	АБТС – 4,5; СГЗ – 6,0	(8,92)	н/и	АБТС: $K_m - 0,49 \text{ мМ}$, $k_{cat} - 1,48 \text{ c}^{-1}$ СГЗ: $K_m - 0,04 \text{ мМ}$, $k_{cat} - 0,35 \text{ c}^{-1}$ 2,6-ДМФ: $K_m - 0,11 \text{ мМ}$, $k_{cat} - 2,93 \text{ c}^{-1}$ Гваякол: $K_m - 0,73 \text{ мМ}$, $k_{cat} - 3,75 \text{ c}^{-1}$	(Kim <i>et al.</i> , 2015)
<i>Serratia</i> <i>marcescens</i> MTCC 4822	53 – Н	Внеклеточная	н/и	н/и	н/и	н/и	АБТС: $K_m - 0,10 \text{ мМ}$	(Kaira <i>et al.</i> , 2015)
<i>Agrobacterium</i> sp. S5-1	50 – ВБ (48,57)	Внутриклеточная в <i>E. coli</i>	50°C	АБТС – 4,5	н/и	4,5 и 7,0	АБТС: $K_m - 230,8 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 32,8 \text{ c}^{-1}$	(Si <i>et al.</i> , 2015)
<i>Paenibacillus</i> <i>glucanolyticus</i> SLM1	90 – ДДС	Внеклеточная в <i>E. coli</i>	40°C	АБТС – 7,0	н/и	5,0 и 7,0	АБТС: $K_m - 38,8 \pm 11,1 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 1400 \text{ c}^{-1}$ 2,6-ДМФ: $K_m - 124,8 \pm 13,5 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 1105 \text{ c}^{-1}$ Катехол: $K_m - 124,8 \pm 13,5 \text{ мкМ}$, $k_{cat} - 8805 \text{ c}^{-1}$	(Mathews <i>et al.</i> , 2016)
<i>Sinorhizobium</i> <i>meliloti</i> L3.8	70 – ДДС (70,5)	Внутриклеточная	80°C	АБТС – 2,2; СГЗ – 5,5; 2,6-ДМФ – 5,0; Феруловая кислота – 6,0; Кофейная кислота – 3,5	4,77	3,0-8,0	АБТС: $K_m - 0,088 \pm 0,004 \text{ мМ}$, $k_{cat} - 3,46 \pm 0,17 \text{ c}^{-1}$ СГЗ: $K_m - 0,019 \pm 0,001 \text{ мМ}$, $k_{cat} - 11,2 \pm 0,56 \text{ c}^{-1}$ 2,6-ДМФ: $K_m - 0,342 \pm 0,055 \text{ мМ}$, $k_{cat} - 48,7 \pm 2,43 \text{ c}^{-1}$ Гваякол: $K_m - 0,244 \pm 0,044 \text{ мМ}$, $k_{cat} - 2,51 \pm 0,13 \text{ c}^{-1}$	(Pawlik <i>et al.</i> , 2016)

* – в скобках указана теоретически рассчитанная величина; ВБ – ММ согласно Вестерн-Блотт анализу; ГФ – ММ согласно данным гель-фильтрации; ДДС – ММ согласно данным электрофореза в денатурирующих условиях; Н – ММ согласно данным электрофореза в неденатурирующих условиях; ГП – гликопротеин; арх. – архея; н/и – не исследовано.

Таблица 2.

Степень гомологии аминокислотных последовательностей 3д лакказ бактерий.

	<i>B.lich.</i>	<i>B.pum.</i>	<i>B.sp.L.</i>	<i>B.sp.H.</i>	<i>B.s.X1</i>	<i>B.cl.</i>	<i>B.s.168</i>	<i>S.lav.</i>	<i>O.sp.</i>	<i>T.th.</i>	<i>A.hyd.</i>
<i>B.lich.</i>	100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.pum.</i>	61,96	100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.sp.L.</i>	99,81	62,16	100%	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.sp.H.</i>	64,52	67,25	64,72	100%	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.s.X1</i>	64,13	66,47	64,33	94,35	100%	-	-	-	-	-	-
<i>B.cl.</i>	58,15	56,58	58,35	58,74	58,94	100%	-	-	-	-	-
<i>B.s.168</i>	65,30	67,84	65,50	98,44	95,13	59,53	100%	-	-	-	-
<i>S.lav.</i>	33,14	33,92	33,33	33,14	33,33	33,79	33,33	100%	-	-	-
<i>O.sp.</i>	23,39	22,35	23,39	20,27	20,47	23,58	20,66	24,39	100%	-	-
<i>T.th.</i>	24,89	24,46	24,89	24,68	24,03	25,11	25,11	22,94	29,87	100%	-
<i>A.hyd.</i>	25,93	24,12	25,93	24,95	24,56	26,52	24,37	25,84	36,02	34,20	100%

B.lich. – *Bacillus licheniformis* (WP_011197606.1), *B.pum.* – *Bacillus pumilus* (WP_003213818.1), *B.sp.L.* – *Bacillus* sp. LS04 (ADZ57281.1), *B.sp.H.* – *Bacillus* sp. HR03 (ACM46021.1), *B.s.X1* – *B. subtilis* X1 (AGK12417.1), *B.cl.* – *B. clausii* KSM-K16 (BAD65184.1), *B.s.168* – *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168 (P07788.4), *S.lav.* – *Streptomyces lavendulae* REN-7 (BAC16804.1), *T.th.* – *Thermus thermophilus* HB27 (BAE16261.1), *O.sp.* – *Ochrobactrum* sp. 531 (ADK66266.1), *A.hyd.* – *A. hydrophila* WL-11 (ACX47357.1). Степень гомологии выражена в процентах.

Таблица 3.

Распространённость сигнального пептида среди охарактеризованных 3д лакказ.

Источник	Последовательность в NCBI	Наличие СП*	Ссылка
Из мангровой почвы	ACV83921.1	+	(Ye <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lysobacter</i> sp. T-15	DL242024.1	-	(Tamaki <i>et al.</i> , 2010)
Микробный метабеном	AER62859.1	+	(Fang <i>et al.</i> , 2012)
Из рубца быка	CAK32504.1	-	(Beloqui <i>et al.</i> , 2006)
<i>Streptomyces lavendulae</i> REN-7	BAC16804.1	-	(Suzuki <i>et al.</i> , 2003)
<i>Ochrobactrum</i> sp. 531	ADK66266.1	+	(Li <i>et al.</i> , 2012)
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	WP_011008265.1	т/у	(Fernandes <i>et al.</i> , 2010)
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	BAE16261.1	+	(Miyazaki, 2005)
<i>Haloferax volcanii</i>	D4GPK6.1	+	(Uthandi <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aquifex aeolicus</i> VF5	AAC07157.1	+, т/у	(Fernandes <i>et al.</i> , 2007)
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain WL-11	ACX47357.1	+	(Wu <i>et al.</i> , 2010)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	BAC00361.1	+	(Ricklefs <i>et al.</i> , 2014)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168	P07788.4	-	(Cho <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus halodurans</i>	AAP57087.1	+	(Ruijsenaars and Hartmans, 2004)
<i>Bacillus</i> sp. HR03	ACM46021.1	-	(Mohammadian <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus</i> sp. LS04	ADZ57281.1	-	(Lu <i>et al.</i> , 2013)
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	WP_003213818.1	-	(Reiss <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus licheniformis</i>	WP_011197606.1	-	(Koschorreck <i>et al.</i> , 2008)
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	BAD65184.1	-	(Brander <i>et al.</i> , 2014)
<i>B. subtilis</i> X1	AGK12417.1	-	(Guan <i>et al.</i> , 2014)
<i>Bacillus subtilis</i>	PDB: 1GSK_A	-	(Martins <i>et al.</i> , 2002)
<i>T. thermophilus</i> SG0.5JP17–16	YP_005641270	+	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> SLM1	KZS44835.1	+	(Mathews <i>et al.</i> , 2016)
<i>Agrobacterium</i> sp. S5-1	AKF11876.1	-	(Si <i>et al.</i> , 2015)
<i>Thermus thermophilus</i> HJ6	ADA81528.1	-	(Kim <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pantoea ananatis</i> Sd-1	WP_028724718.1	+	(Shi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Thioalkalivibrio</i> sp. ALRh	ADC72415.1	+	(Ausec <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bacillus</i> sp. SL-1	AMZ01554.1	-	(Safary <i>et al.</i> , 2016)

* – данные о наличии сигнального пептида (СП) или трансмембранного участка (т/у) получены с использованием онлайн-программы InterPro.

1. 6. 1. 2. Субстраты и ингибиторы

Субстраты 3д бактериальных лакказ – многие фенольные и нефенольные соединения, являющиеся субстратами и грибных лакказ (п. 1.5.2.). В таблице 4 представлены соединения, которые окисляются различными бактериальными 3д лакказами.

Таблица 4.

Субстраты, окисляемые 3д бактериальными лакказами.

Ароматические карбоновые кислоты	Кумаровая кислота, синаповая кислота, феруловая кислота, кофейная кислота, 3,4-дигидроксibenзойная кислота, сиреневая кислота, галловая кислота, 3-амино-4-гидроксibenзойная кислота, 4-амино-3-гидроксibenзойная кислота, ванилиновая кислота, 3-гидроксиантралиловая кислота, дигидрофенилаланин, 3,4-дигидроксифенилаланин (L-ДОФА), 3-гидрокси-альфа-метил-L-тирозин (L-метил-ДОФА), L-3,4-дофамин
Ароматические спирты	Гваякол, 3-метокси-4-гидроксibenзиловый спирт, 3-гидрокси-4-метоксибензиловый спирт, 4-метоксибензиловый спирт, кониферилловый спирт, орто-, мета-, пара-крезол, 2,6-диметоксифенол, катехол, 4-метилкатехол, пирогаллол, гидрохинон, 2,4,6-триметилфенол, 3-метилкатехол, эвгенол, арбутин, ресвератрол, кверцетин, 1,3-дигидроксibenзол (резорцинол), вератровый спирт, альфа-нафтол
Ароматические кетоны	Ацетованилон, ацетосирингон
Ароматические альдегиды	Ванилин, сиреневый альдегид, этилванилин, синаповый альдегид, кониферилловый альдегид
Ароматические амины	Дофамин гидрохлорид, <i>n</i> -фенилендиамин, тирамин, 3,3'-диметилбензидин, 3,3'-диаминобензидин тетрагидрат, фенилгидразин, промазин, тетраметилбензидин
Ароматические эфиры	Метилванилат, метилсирингат
Полифенолы	Таниновая кислота
Ароматические азосоединения	АБТС, сирингальдазин
Трифениловые соединения	Фенолфталеин, трифениламин
Другие соединения	Билирубин, L-аскорбиновая кислота, ферроцианид калия (K ₄ Fe(CN) ₆)

Классические ингибиторы грибных 3д лакказ, такие как азид натрия, L-цистеин, а также дитиотреитол, также ингибировали активность бактериальных 3д лакказ. Хелатирующий агент ЭДТА в случае лакказ *Bacillus* sp. ADR, *B. vallismortis*, *S. maltophilia*, *S. cyaneus* оказывал ингибирующий эффект. В то же время ЭДТА в отношении лакказ *B. amyloliquefaciens* (10 и 25 мМ), *B. licheniformis* (10 мМ), *H. volcanii* (50 мМ) была неэффективной, как ингибитор.

ДДС-Na может как ингибировать, так и стимулировать активность. Так, 0,1 мМ ДДС-Na оказывал стимулирующий эффект на лакказу *B. amyloliquefaciens*, а 1 мМ ДДС-Na – слабый ингибирующий эффект (Pan *et al.*, 2011). Низкая концентрация ДДС-Na (50 мкМ)

стимулировала активность лакказы Lac15 из метагенома (до 127%), при увеличении концентрации ДДС-Na активность снижалась и достигала значения 50% при 0,5 мМ ДДС-Na (Fang *et al.*, 2011).

Ингибиторами 3д бактериальных лакказ являются мочевины, тиомочевина, 1,10-фенантролин, 2,2-дипиридил, тиогликолят натрия, диэтилдитиокарбамат, койевая кислота, трополон, фенилтиомочевина, коричная кислота, тиогликолевая кислота.

Ионы металлов могут оказывать различный эффект на активность 3д лакказ бактерий. Активность лакказы из γ -протеобактерии JB слабо стимулировалась ионами Co^{2+} (105,60%), Ca^{2+} (108,0%), Mg^{2+} (107,50%) и Mn^{2+} (111,85%), а ингибировали активность ионы Zn^{2+} (87,80%), Cd^{2+} (23,30%) и Ag^{+} (19,78%) (Singh *et al.*, 2007). Также ионы Ca^{2+} и Mn^{2+} слегка стимулировали активность рекомбинантной лакказы *Streptomyces lavendulae* REN-7 (Suzuki *et al.*, 2003). Лакказу *Pseudomonas desmolyticum* ингибировали $CaCl_2$ (12%), $HgCl_2$ (20%), $MgCl_2$ (51%) и $CuSO_4$ (0%) (Kalme *et al.*, 2009). Данные о влиянии некоторых ионов на активность различных 3д лакказ бактерий представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Влияние ионов металлов на активность 3д бактериальных лакказ.

3д лакказа, ссылка	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{2+}	Co^{2+}	Zn^{2+}	K^{+}	Cu^{2+}	Cd^{2+}	Ag^{+}	Hg^{2+}
Из γ -протеобактерии JB (Singh <i>et al.</i> , 2007)	+	+	+	н/и	+	-	н/и	н/и	-	-	н/и
Из <i>P. desmolyticum</i> (Kalme <i>et al.</i> , 2009)	-	-	н/и	н/и	н/и	н/о	н/и	-	н/и	н/и	-
STSL (Suzuki <i>et al.</i> , 2003)	+	-	+	н/и	н/и	-	+	-	н/и	н/и	н/и
p-lac (Suzuki <i>et al.</i> , 2003)	+	н/э	н/э	н/и	н/и	+	+	+	н/и	н/и	н/и
Из <i>S. psammoticus</i> * (Niladevi <i>et al.</i> , 2008)	-	+	-	+	-	+	+	+	-	н/о	-
Lac15 (Fang <i>et al.</i> , 2011)	н/э	+	+	н/и	-	-	н/э	н/и	н/и	н/и	н/и
Lac21 (Fang <i>et al.</i> , 2012)	н/э	-	-	н/и	-	-	+	н/и	н/и	н/и	н/и
Lac591 (Ye <i>et al.</i> , 2010)	+	-/+	-	+	-	-	+	н/и	н/и	н/и	н/и
Lac4 (Shi <i>et al.</i> , 2015)	-	-	-	-	-	-	-	+	н/и	н/и	н/и
Atm (Si <i>et al.</i> , 2015)	н/и	н/и	+	-	н/и	-	н/и	+	н/и	н/и	н/и

* – для данного фермента не указана степень окисления ионов металлов; «+» – оказывает активирующий эффект; «-» – оказывает ингибирующий эффект; н/э – не оказывает эффекта; н/и – эффект не исследован.

В отличие от 3д лакказ грибов, большинство охарактеризованных 3д лакказ бактерий – галотолерантные ферменты. Они способны сохранять активность даже при высоких концентрациях NaCl (1M), причём, может наблюдаться даже небольшое возрастание

активности фермента. Это свойство может быть полезным в случае практического применения таких ферментов. Для лакказы CotA *B. clausii* было показано, что NaCl до 1М концентрации стимулировал фермент только в щелочных условиях (при pH>7), причём максимальная активность фермента наблюдалась при pH 8,0 и концентрации соли 0,4-0,6 М (Brander *et al.*, 2014). Однако есть ферменты, которые ингибируются высокими концентрациями соли, например, лакказы *Bacillus* sp. HR03 и *Bacillus vallismortis* (Mohammadian *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

1. 6. 1. 3. Физико-химические свойства

Оптимумы pH для 3д бактериальных лакказ при использовании в качестве субстратов органических соединений, обычно находится в интервале 6,0-8,0. Кривая зависимости активности от величины pH раствора имеет колоколообразную форму, как и у 3д грибных лакказ (п. 1.5.3.). Оптимум pH при использовании в качестве субстрата донора электронов (АБТС) обычно находится в интервале 3,0-5,0. Бактериальные 3д лакказы более стабильны при щелочных значениях pH. Исключение составляет фермент *B. vallismortis*, более стабильный при pH 3,0 (Zhang *et al.*, 2012).

Температурный оптимум 3д лакказ расположен в весьма широком диапазоне температур: от 40 до 90°C. Самое высокое значение оптимальной температуры окисления субстратов характерно для гипертермофильных бактерий из рода *Thermus*: *T. thermophilus* HB27 (92°C) (Miyazaki, 2005) и *T. thermophilus* SG0.5JP17-16 (90°C) (Liu *et al.*, 2015). Многие 3д лакказы бактерий являются термостабильными ферментами. Например, время полуинактивации лакказы из *T. thermophilus* HB27 при 80°C составляло более 14 ч (Miyazaki, 2005). Для лакказы McoP из археобактерии *Pyrobaculum aerophilum* составляло примерно 6 ч (Fernandes *et al.*, 2010). Для лакказы CotA из *B. subtilis* время полуинактивации при 80°C было равным 2 ч для очищенного фермента, и 4 часа для фермента, ассоциированного со спорами (Martins *et al.*, 2002).

1. 6. 1. 4. Функции

Доказанные функции бактериальных 3д лакказ – это участие в споруляции и пигментации. Вероятно, бактериальные лакказы катализируют полимеризацию компонентов оболочки спор, подобно тому, как растительные лакказы осуществляют формирование клеточной стенки, катализируя полимеризацию лигнина. Лакказа CotA из *B. subtilis* обеспечивала пигментацию спор (синтез меланина). Пигментированные споры были более

устойчивы к воздействию ультрафиолетового (УФ) излучения и пероксида водорода, чем непигментированные, образованные мутантным штаммом *B. subtilis* без гена *cotA*. (Hullo *et al.*, 2001). Лакказная активность *B. sphaericus* строго коррелировала с образованием дипиколиновой кислоты и началом процесса споруляции (Claus and Filip, 1997). Пигментированные споры *Bacillus* sp. HR03 проявляли высокую устойчивость к воздействию пероксида водорода, а также к УФ-излучению. Биоинтез пигмента спор осуществлялся с участием лакказы (Mohammadian *et al.*, 2010).

Медьсодержащая оксидаза CueO *E. coli* играет роль в устойчивости бактерии к высокой концентрации ионов Cu^{2+} . Фермент содержит участки, богатые аминокислотами метионином и гистидином, которые частично перекрывают подход к T1-металлоцентру. Эти участки формируют дополнительные сайты связывания ионов меди, и при её избытке открывают доступ окисляемому субстрату к T1-металлоцентру (Roberts *et al.*, 2002). Лакказе Lbh1 *B. halodurans* также была необходима высокая концентрация ионов меди для проявления высокой оксидазной активности. Это может свидетельствовать о сходной биологической роли оксидазы CueO и лакказы Lbh1 (Ruijssenaars and Hartmans, 2004).

Было показано участие 3д лакказ бактерий в биодegradации полимерных соединений. Так, штамм *Pandoraea* sp. В-6 был способен разлагать крафт-лигнин. В процессе его деградации бактериальной культурой сначала детектировалась высокая активность марганец пероксидазы, а затем лакказы (Shi *et al.*, 2013a). Аналогичные результаты были получены при разложении крафт-лигнина культурой *Cupriavidus basilensis* В-8. На основании этих результатов авторы предположили, что ключевая роль в деполимеризации лигнина принадлежит марганец пероксидазе, а трансформацию продуктов деполимеризации осуществляет 3д лакказа (Shi *et al.*, 2013b).

Исследовано влияние лакказы на сорбцию йодида натрия почвой. Лакказа окисляла йодид до молекулярного йода или йодноватистой кислоты, которые легко встраиваются в органические соединения почвы (Seki *et al.*, 2012).

1. 6. 1. 5. Способы получения: индукция, суперэкспрессия

Обычно для получения 3д бактериальных лакказ используют методы молекулярной биологии (клонирование и дальнейшая экспрессия известной последовательности гена). Большинство охарактеризованных ферментов представляют собой рекомбинантные белки, экспрессированные в гомологичной или гетерологичной системе (табл. 1). В случае-экспрессии в гомологичной системе, лакказа может спонтанно локализоваться на спорах продуцента, как

это наблюдалось при экспрессии гена *cotA* из штамма *B. subtilis* 168 в штамме *B. subtilis* DB104 (Cho *et al.*, 2011), или секретироваться в культуральную жидкость, как в случае экспрессии гена *lccA* из *H. volcanii* DS70 в *H. volcanii* H26 (Uthandi *et al.*, 2010). При экспрессии в гетерологичной системе (в штаммах *E. coli*) обычно происходит внутриклеточная аккумуляция фермента. Наиболее часто для экспрессии используют штаммы BL21(DE3), Rosetta (DE3) и др., а также векторы pET-22b(+), pQE-70 и др., позволяющие получать рекомбинантный белок, сшитый с шестью гистидинами на С- или (и) N-конце (Fang *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2015). При экспрессии в штаммах *P. pastoris* наблюдалась секреция фермента в культуральную среду (Lu *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2015).

Некоторые бактериальные лакказы продуцировались при культивировании на жидких средах или твёрдом субстрате. Индукторами синтеза лакказ были ионы меди. Эффект индукции ионами меди при культивировании в жидкой среде был показан для лакказ *B. licheniformis* LS04 (Lu *et al.*, 2012), *S. meliloti* (Castro-Sowinski *et al.*, 2002), *B. amyloliquefaciens* LC02 (Pan *et al.*, 2011), *S. maltophilia* AAP56 (Galai *et al.*, 2008), *T. thermophilus* HB27 (Miyazaki, 2005). Также продукция лакказы наблюдалась при культивировании штаммов-продуцентов на богатых комплексных средах. Так, фермент продуцировался штаммом *B. subtilis* WPI при культивировании на среде с дрожжевым экстрактом, триптоном и NaCl (Sheikhi *et al.*, 2012). Лакказа из штамма *Bacillus* sp. ADR продуцировалась при культивировании на среде с дрожжевым экстрактом, пептоном и NaCl (Telke *et al.*, 2011), а из штамма *P. desmolyticum* NCIM 2112 – на среде с пептоном, NaCl и экстрактом говядины (Kalme *et al.*, 2009).

Продукция лакказы *S. psammoticus* MTCC 7334 наблюдалась при твердофазном культивировании на рисовой соломе, увлажнённой раствором дрожжевого экстракта с солями ((NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCO₃, CuSO₄) (Niladevi *et al.*, 2008).

1. 6. 2. Бактериальные 2д лакказы

1. 6. 2. 1. Структура, клеточная локализация

Двухдоменные лакказы и двухдоменные лакказоподобные ферменты были открыты сравнительно недавно. К настоящему времени описаны семь 2д лакказ, шесть из бактерий рода *Streptomyces*. Это белок EроА из штамма *S. griseus* (Endo *et al.*, 2003), SilA из *S. ipomoea* (Molina-Guijarro *et al.*, 2009), SLAC из *S. coelicolor* (Machczynski *et al.*, 2004; Dube *et al.*, 2008), а также Ssl1 из *S. sviveus* (Gunne and Urlacher, 2012), LMCO из *S. pristinaespiralis* (Ihssen *et al.*, 2015), MCO из *S. griseorubens* (Feng *et al.*, 2015), и PPO из *N. europaea* (DiSpirito *et al.*, 1985).

ММ 2д лакказ составляет 32-44 кДа. Для 2д бактериальных лакказ, в отличие от большинства лакказ грибного происхождения, гликозилирование не характерно. Они представляют собой внеклеточные ферменты. При использовании диких штаммов продукция внеклеточных бактериальных 2д лакказ зависит, главным образом, от выбора условий индукции. Так, при культивировании дикого штамма *S. griseus*, активность ЕроА фиксировалась как в культуральной среде, так и в клеточном экстракте. Внесение ионов меди в качестве индукторов синтеза белка вызывало усиленное внутриклеточное продуцирование фермента псевдомицелием (Endo *et al.*, 2002). При продукции рекомбинантного белка гЕроА в *E. coli* лакказная активность наблюдалась только в цитоплазматической фракции (Endo *et al.*, 2003).

Для 2д лакказ бактерий, как и для 3д грибных лакказ характерно наличие в активном центре трёхъядерного медного кластера, состоящего из четырёх атомов меди. Атом меди Т1-центра также координирован двумя остатками гистидина и одним остатком цистеина (Dugao *et al.*, 2006), атомы меди Т2- и Т3-медных центров образуют трёхъядерный медный кластер, в котором медь Т2-центра координирована двумя, а Т3-центра – шестью остатками гистидина (Solomon *et al.*, 1996; Enguita *et al.*, 2003) (рис. 12 А). В отличие от классических 3д лакказ грибов, для 2д лакказ характерно наличие метионина в качестве дополнительного лиганда Т1-медного центра. Спектр поглощения 2д лакказ сходен с таковым у 3д лакказ. Максимум поглощения при 590-600 нм указывает на наличие Т1-медного центра, а плечо при 330 нм – Т3-медного центра (рис. 12 Б).

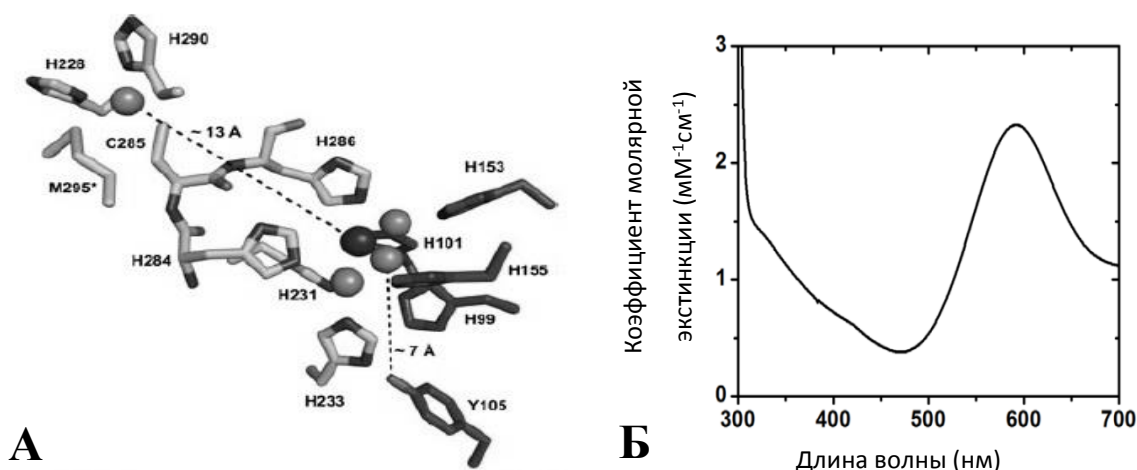


Рисунок 12. Металлоцентры 2д лакказы. **А.** Структура медного кластера 2д лакказы Ssl1 (Gunne *et al.*, 2014). Серые сферы – ионы меди, тёмно-серая сфера – связанный кислород. **Б.** Спектр поглощения 2 д лакказы Ssl1 с максимумом поглощения при 590 нм и плечом при 330 нм (Gunne and Urlacher, 2012).

В отличие от классической 3д лакказы, для которой характерно наличие трёх структурных доменов, для 2д лакказы характерно наличие только двух доменов (рис. 13 А, Б). 2д лакказа в форме мономера неактивна. Каталитически активная форма 2д лакказы представляет собой гомотример.

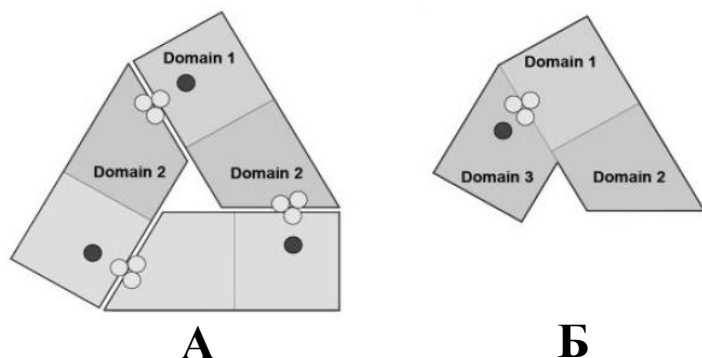


Рисунок 13. Структурная организация 2д и 3д лакказ (Lawton *et al.*, 2009). А – тример 2д лакказы, Б – мономерная 3д лакказа. Черная сфера – Т1-медный центр, серая сфера Т2/Т3-медный кластер.

В классических 3д грибных лакказах Т1-медный центр локализован в третьем домене, а Т2/Т3 медный кластер – между первым и третьим доменами (Piontek *et al.*, 2002). У 2д лакказ из группы В (п. 1.4.) Т1-медный центр фермента локализован на втором домене каждой субъединицы, а Т2/Т3 медный кластер – между вторым доменом каждой субъединицы, и первым доменом следующей субъединицы (рис. 9).

Сравнение моделей трёхмерных структур тримера 2д лакказы *SLAC* из *S. coelicolor* и мономерной 3д лакказы гриба-аскомицета *Melanocarpus albomyces* обнаруживает следующие особенности их строения:

1. Первые домены ферментов сходны по структуре и функционально;
2. Т1-медный центр у бактериальной лакказы расположен во втором домене, а у грибной – в третьем домене;
3. В тримере 2д лакказы у каждой субъединицы второй домен локализован напротив первого домена другой субъединицы и выполняет роль доменов 2 и 3 грибной лакказы. Второй домен соседней цепи выполняет роль третьего домена грибной лакказы (по результатам анализа гомологии нуклеотидных последовательностей и пространственной локализации Т1-медного центра, и роль второго домена грибной лакказы (на основании данных по расположению и пространственной локализации нуклеотидных последовательностей разных субъединиц (Skalova *et al.*, 2009).

Таким образом, один «отсутствующий» домен у бактериального фермента представляет собой аналог второго домена 3д грибной лакказы, функцию которого взял на себя второй домен 2д лакказы.

Выравнивание доступных в базах данных аминокислотных последовательностей охарактеризованных и не охарактеризованных 2д бактериальных лакказ позволяет увидеть наличие четырёх консервативных медь-связывающих участков, которые представлены десятью остатками гистидинов и одним остатком цистеина (рис. 14). Для 2д лакказ характерно наличие сигнального пептида на N-конце белка, включающего консервативный диаргининовый мотив (транспорт по ТАТ-секреторному пути). ТАТ-секреторный путь позволяет транспортировать белки, прошедшие фолдинг, через клеточную мембрану. Для некоторых 3д бактериальных лакказ также характерно наличие ТАТ-сигнального пептида, но эта особенность свойственна не всем 3д лакказам бактериального происхождения.

```

WP_030623358.1 -----MDRRTFSSRRMLVGGAAVAATGVTSLSLGAVEASSAENPPR-----TAPAGGVT 48
WP_030846765.1 -----MDRRAFSSRRMLVGGAAAAATGVTSLSLGAVEASSAEKPPR-----TAPAGGVV 48
NP_630785.1 -----MDRRGFNRRVLLGGAAAATS----LSI-APEVAGAAPAAKGITARTAPAGGEV 48
ABH10611.1 -----MDRRGFNRRVLLGGAAVATS----LSI-APETAGAAGDAKGVRTARTAPAGGEV 48
WP_007386096.1 ----MGALDRRGFNRRVLLGGAAVATS----LSL-APEARSDAGPAQ-----AAPGGEV 45
WP_003994334.1 -----MDRRSFNRRVLLGGAAVATS----LSV-APEAISADGPAK-----TAPAGGEV 43
WP_030829165.1 MSDAPGITSSRRGLSRRLFTGGAAAAAVGPLALSSPAAAKAPAAVAARSAEVRTAAAGGTV 60
WP_020866445.1 MSDAPGFTSRRGLSRRLFTGGAAAAAVGPLALTS PAAAKAPKAPAAGSGGVDTAAAGGTV 60
      .** :.**.: ****.*:      *: *      .      *..** .

WP_030623358.1 RRLKMYAEKLPNGELGYGFEK GKASIPGLIELNEGDTLHIEFENLTDVDASLHVHGVDY 108
WP_030846765.1 RRLKMYAEKLPDQQLGYGFEK GKASIPGLIELNEGDTVHIDFENLTDVDASLHVHGVDY 108
NP_630785.1 RHLKMYAEKLDAGQMGYGFEGK GKASVPGPLIEVNEGDTLHIEFTNTMDVRASLHVHGLDY 108
ABH10611.1 RHIKMYAEKLPDQMGYGFEGK GKASVPGPLIELNEGDTLHIEFTNTMDVRASLHVHGLDY 108
WP_007386096.1 RRIKLYAERLADGQMGYGFEGK GRATIPGLIELNEGDTLHIEFENTMDVRASLHVHGLDY 105
WP_003994334.1 KRIKLYAEKLPDQMGYGFEGK GKASIPGLIELNEGDTLHVEFENTMDVAVSLHVHGLDY 103
WP_030829165.1 RRLKLYAEKLPDQMGYGFEGK GKASIPGLIELTEGDTLHIEFENTMDVTASLHVHGLDY 120
WP_020866445.1 RRLKLYAEKLPDGSMDYGFEGK GKASIPGLIELTEGDTLHIEFENTMDVTASLHVHGLDY 120
      ::*:***:*.:.:***:***:*.:*****:..***:*.:* * ** .*****:**

WP_030623358.1 DIANDGTRMKNKSHVEPGGTRTYTWRTHKPGNRKDGTYEPGSAGYWHYHHDHHVVGTDHGTGG 168
WP_030846765.1 DIANDGTRMKNKSHVEPGGTRTYTWRTHAPGRRKDGTYEPGSAGYWHYHHDHHVVGTDHGTGG 168
NP_630785.1 EISSDGTAMNKSDVEPGGTRTYTWRTHKPGRRDDGTWRPGSAGYWHYHHDHHVVGTEHGTGG 168
ABH10611.1 EISSDGTAMNKSDVEPGGTRTYTWRTHKPGRRADGTWRAGSAGYWHYHHDHHVVGTEHGTGG 168
WP_007386096.1 EVSSDGTTLNKSDVEPGGTRTYTWRTHAPGRRSDGTWRAGSAGYWHYHHDHHVVGTEHGTGG 165
WP_003994334.1 EITSDGTTLNRSHVEPGGTRTYTWRTHAPGRRKDGTYEPGSAGYWHYHHDHHVVGTEHGTGG 163
WP_030829165.1 DVASDGTQLNRSAVEPGGTRTYTWRTHTPGKRADGTWRPGSAGYWHYHHDHHAVGTPHGTGG 180
WP_020866445.1 DVASDGTQLNRSAVEPGGTRTYTWRTHAPGKRADGTWRPGSAGYWHYHHDHHAVGTPHGTGG 180
      ::..*** :*: * ***** **.* ***:..*****.*** ** *

WP_030623358.1 IRKGLYGPVIVRRKGDILPDQTCTVVFNDMTINNKAEHNSVNFEATVGDRLFVMI THGE 228
WP_030846765.1 IRKGLYGPVVVRRKGDILPDQTCTVVFNDMMINNKTAHNSVNFEATVGDRLFVMI THGE 228
NP_630785.1 IRNGLYGPVIVRRKGDVLPDATHTIVFNDMTINNRPHTGPDFEATVGDRLFVMI THGE 228
ABH10611.1 IRKGLYGPVIVRRKGDVLPDATHTIVFNDMLINNRAPHTGPNFEATVGDRLFVMI THGE 228
WP_007386096.1 IRKGLYGPVIVRRKGDVLPDATHTIVFNDMLINNRPAHSGPNFEATVGDRLFVMI THGE 225
WP_003994334.1 LQKGLYGPVIVRRKGDVLPDRKHTVVFNDMIRINRPPHSGPDFEATVGDRLFVMI THGE 223
WP_030829165.1 LRKGLYGPVVRRAGDILPEKQFTIVFNDMTINNKSAGHDAPEFRATVGDRLFVMI THGE 240
WP_020866445.1 LRKGLYGPVVRRAGDILPEKQFTIVFNDMTINNKAHDAPEFRATVGDRLFVMI THGE 240
      :::*****:*** **:*: *:* ***** **:* * . :*.*****:*.:*****

WP_030623358.1 YYHTFHFMHHGHRWADNRTGLLTPDDPSRVIDNKICGPADSFGLQIIAGERV GAGAWMYHC 288
WP_030846765.1 YYHTFHFMHHGHRWADNRTGLLTPDDPSRVIDNKICGPADSFGLQIIAGERV GAGAWMYHC 288
NP_630785.1 YYHTFHFMHHGHRWADNRTGILTPDDPSRVIDNKITGPADSFGLQIIAGEG V GAGAWMYHC 288
ABH10611.1 YYHTFHFMHHGHRWADNRTGMLTPDDPSQVIDNKITGPADSFGLQIIAGEG V GAGAWMYHC 288
WP_007386096.1 YYHTFHFMHHGHRWADNRTGMLTPDDPSQVVDNKIVGPADSFGLQVIAGEG V GAGAWMYHC 285
WP_003994334.1 FYHTFHFMHHGHRWADNRTGMLTPDDPSQVIDNKITGPADSFGLQVIAGEG V GAGAWMYHC 283
WP_030829165.1 YYHTFHFMHHGHRWADNRTGLLAGPDDVSRIIDNKITGPADSFGLQVIAGE N V GAGAWMYHC 300
WP_020866445.1 YYHTFHFMHHGHRWADNRTGLLEGPDDVSRIIDNKITGPADSFGLQVIAGE N V GAGAWMYHC 300
      :*****:*****:* **** *:::**** *****:*.**** *****

```

WP_030623358.1	H VQ S HSDMG M AGLLLIKKPDGTIPGYEPHHHSAGATEKKAGEKTGEKGEKA E KA E KSAD 348
WP_030846765.1	H VQ S HSDMG M AGLLLIKKPDGTIPGYEPHHSTAGAE E EKRTENGAGEK-----A 336
NP_630785.1	H VQ S HSDMG M VGLFLVKKPDGTIPGYEPHEHG-----ATAKSGESG E PT 333
ABH10611.1	H VQ S HSDMG M VGLFLVKKPDGTIPGYDPHEH-----AHGG--G E PT 327
WP_007386096.1	H VQ S HSDMG M VGLFLVKKTDGTIPGYEPHEH-----S 317
WP_003994334.1	H VQ S HSDMG M VGLFLVKKPDGTIPGYDPHEHG-----EQ 317
WP_030829165.1	H VQ S HSDMG M AGLFLVAKPDGTIPGYEPHRLS----- 332
WP_020866445.1	H VQ S HSDMG M AGLFLVAKADGTIPGYDPHRLS----- 332
	*****.**:*: *.*****:***.
WP_030623358.1	TGAAEHQH-- 356
WP_030846765.1	AGAGGHQH-- 344
NP_630785.1	GGAAAHENEH 343
ABH10611.1	ADAPAHQH-- 335
WP_007386096.1	GQRAEHHH-- 325
WP_003994334.1	PPAGGHEH-- 325
WP_030829165.1	AHRAG----- 337
WP_020866445.1	AHRPG----- 337

Рисунок 14. Выравнивание аминокислотных последовательностей 2д бактериальных лакказ. *S. albus* (WP_030623358.1), *S. griseus* (WP_030846765.1), *S. coelicolor* (NP_630785.1), *S. ipomoeae* (ABH10611.1), *S. sviceps* (WP_007386096.1), *S. viridochromogenes* (WP_003994334.1), *S. hygrosopicus* (WP_030829165.1), *S. rapamycinicus* (WP_020866445.1). Жирным шрифтом и подчёркиванием выделены консервативные медь-связывающие аминокислоты. Жирным шрифтом и курсивом выделены аксиальные лиганды Т1-медного центра. Последовательности сигнального пептида выделены подчёркиванием. Звёздочки – идентичные аминокислоты, одна или две точки – гомологичные аминокислоты.

Несмотря на то, что для 2д лакказ так же, как и для классических 3д лакказ, характерно наличие четырёх консервативных медь-связывающих мотивов, гомология полной последовательности белков очень низка. Следует учитывать тот факт, что нуклеотидные последовательности 2д лакказ, как представителей особого подкласса бактериальных лакказ, нецелесообразно выравнивать с последовательностями трёхдоменных лакказ бактериального или грибного происхождения, из-за отсутствия одного структурного домена.

1. 6. 2. 2. Субстраты и ингибиторы

Субстратами 2д лакказ, как и в случае 3д лакказ грибов, являются два типа соединений – доноры протона и электрона (фенольные и аминные субстраты: катехол, гваякол, дофамин и др.), и доноры электрона (АБТС, ферроцианид и др.). В таблице 6 представлен перечень органических и неорганических субстратов, окисляемых 2д лакказами. Лакказы MCO, SLAC, SilA и Ssl1 окисляли типичные субстраты 3д лакказ: АБТС и 2,6-ДМФ. Сирингальдазин, являющийся тестовым субстратом 3д лакказ, окислялся только MCO, SLAC, SilA и Ssl1.

Фермент EроА сильно отличался по субстратной специфичности от других 2д лакказ и не окислял ни 2,6-ДМФ, ни сиригальдазин. В отношении АБТС его активность не измерялась (Endo *et al.*, 2003).

Особенность 2д лакказ – высокая гомология аминокислотных последовательностей (табл. 7). Как и у 3д грибных лакказ, у 2д лакказ один и тот же субстрат может окисляться одним ферментом, и не окисляться другим (табл. 6). Более того, даже в отношении окисления «универсальных» субстратов, для ферментов характерны сильно различающиеся кинетические характеристики. Так, K_m в отношении 2,6-ДМФ составляла 890 мкМ (при pH 9,0) для Ssl1, 4270 мкМ (при pH 8,0) для SilA, 500 мкМ (при pH 10,0) – 3500 мкМ (при pH 7,2) для SLAC (Machczynski *et al.*, 2004).

Таблица 6.

Субстратная специфичность 2д лакказ.

Субстраты	2д лакказы					
	EроА	LMCO	MCO	SilA	SLAC	Ssl1
АБТС	н/и	+	+	+	+	+
Ферроцианид	н/и		н/и	+	н/и	н/и
2,6-ДМФ	-	+	+	+	+	+
Сиригальдазин	-	-	+	+	н/и	+
Тирозин	-	н/и	н/и	-	н/и	-
2-метоксифенол	-	-	+	+	н/и	+
3-метоксифенол	+	н/и	н/и	-	н/и	н/и
4-метоксифенол	-	н/и	н/и	+	н/и	н/и
Катехол	-	-	н/и	+	н/и	н/и
ДМП	+	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и

«+» – окисляется лакказой; «-» – не окисляется лакказой; н/и – не исследовано.

Таблица 7.

Степень гомологии аминокислотных последовательностей 2д лакказ.

	EроА	LMCO	MCO	SilA	SLAC	Ssl1
EроА	100*	-	-	-	-	-
LMCO	76,45	100	-	-	-	-
MCO	74,01	74,22	100	-	-	-
SilA	76,13	76,01	86,65	100	-	-
SLAC	74,78	76,07	85,06	92,24	100	-
Ssl1	74,84	73,75	84,64	88,61	84,78	100

* – степень гомологии в %, рассчитана в программе Clustal Omega.

Таблица 8.

Ингибиторы 2д лакказ.

Ингибиторы	2д лакказы, остаточная активность, %				
	ЕроА	МСО	SilA	SLAC	Ssl1
NaN ₃	0,1 мМ (6,5)* – 73 1 мМ (6,5) – 68	1 мМ (9,0) – 94,5	10 мМ (5) – 60,3 10 мМ (8) – 94,9	10 мМ (4) – 78	10 мМ (9,0) – 95
NaCN	0,1 мМ (6,5) – 38 1 мМ (6,5) – 0	н/и	н/и	н/и	н/и
KCN	н/и	н/и	100 мкМ (5) – 34,1 100 мкМ (8) – 45,8	н/и	н/и
ЭДТА	1 мМ (6,5) – 67	1 мМ (9,0) – 37,5	10 мМ (5) – 101,1 10 мМ (8) – 36,8	10 мМ (4) – 100	н/и

* – в скобках указана величина рН; н/и – не исследовано.

В таблице 8 показано влияние некоторых ингибиторов 3д лакказ на активность 2д лакказ. Азид натрия – эффективный ингибитор 3д лакказ, чей ингибирующий эффект основан на связывании с Т2/Т3-медным кластером и блокировкой его функционирования, оказывает ингибирующий эффект и на активность 2д лакказ, однако степень ингибирования 2д лакказ гораздо ниже, чем 3д грибных лакказ. Так, азид натрия в концентрации 1мМ ингибировал активность фермента ЕроА до 68% от начальной активности (Endo *et al.*, 2003). Ионы CN⁻ также оказывают ингибирующий эффект на активность 2д лакказ. ЭДТА, ингибирующее действие которой основано на хелатировании атомов меди в активном центре, в зависимости от рН среды может слабо влиять или совсем не влиять на активность 2д белков.

Влияние ионов металлов на активность 2д лакказ практически не изучено. Только в отношении активности 2д лакказ SilA из *S. ipomoea* и МСО из *S. griseorubens* было изучено действие некоторых ионов. В кислых и щелочных условиях Fe²⁺ и Cu²⁺ ингибировали активность SilA (остаточная активность лакказы в присутствии 1 мМ FeSO₄ при рН 5,0 и 8,0 составляла 0% и 1,4%, соответственно, в присутствии 1мМ CuSO₄ – 38,4% и 62,3%, соответственно). MgSO₄ и CoSO₄ при рН 5,0 стимулировали активность фермента. NaCl при рН 5,0 ингибировал, а при рН 8,0 стимулировал активность фермента (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). MnCl₂, CuCl₂ и CaCl₂ при рН 9,0 стимулировали активность МСО, в то время как HgCl₂ и CdCl₂ ингибировали активность лакказы (Feng *et al.*, 2015). Очевидно, данных анализа двух ферментов недостаточно, чтобы сделать заключение о влиянии ионов металлов на все 2д лакказы.

1. 6. 2. 3. Физико-химические свойства

Оптимум рН для 2д лакказ при использовании в качестве субстратов органических соединений, – доноров протонов и электронов (2,6-ДМФ), обычно находится в интервале 8,0-9,4, а кривая зависимости активности от величины рН раствора имеет колоколообразную форму, как и у 3д грибных лакказ (Yoshitake *et al.*, 1993; Shiba *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 1999). Такой профиль рН активности 2д лакказ при окислении фенольных соединений, как и в случае 3д ферментов, определяется двумя разнонаправленными эффектами (п. 1.5.3.).

Оптимум рН для 2д лакказ при окислении доноров электронов ($K_4Fe(CN)_6$, АБТС) находится в интервале 4,0-5,0. Кривая зависимости активности от величины рН раствора также имеет колоколообразную форму. Активность 2д достигнет максимального значения при рН 4,0-5,0. Стоит отметить, что активность 3д грибных лакказ монотонно падает при изменении рН раствора от 2,5 до 7,0 (Fukushima and Kirk, 1995; Baldrian, 2004; Quarantino *et al.*, 2007; Wahleithner *et al.*, 1996; Shleev *et al.*, 2005). Колоколообразную форму профиля зависимости рН от активности 2д лакказ можно объяснить высокой нестабильностью фермента при рН<4,0. И при преодолении данной точки нестабильности активность возрастает, а затем вновь начинает падать за счёт возрастающего ингибирующего действия ОН-ионов.

В целом, 2д лакказы более стабильны при щелочных значениях рН. Показано, что 2д лакказа Ssl1 после инкубирования в течение пяти дней при величине рН 11,0 сохраняла 80% начальной активности. В более кислых условиях фермент был менее стабилен: после одного дня инкубирования при величине рН 4,0 лакказа теряла 65% своей начальной активности, а при рН 3,0 полностью инактивировалась в течение 30 мин (Gunne and Urlacher, 2012). Лакказа SilA сохраняла вплоть до 100% своей начальной активности после инкубирования при значениях рН 5,0-9,0. В то же время фермент терял около 50% начальной активности после инкубирования при значениях рН 3,0-4,0 (Molina-Guijarro *et al.*, 2009).

Температурный оптимум 2д лакказ находится в диапазоне 40-60°C. 2д Лакказы являются весьма стабильными белками. Время полуинактивации лакказы Ssl1 составляло 90 мин при температуре 60°C, 30 мин при 70°C (Gunne and Urlacher, 2012). Для лакказы SLAC этот показатель составил 110 мин при 70°C (Dube *et al.*, 2008). Фермент SilA сохранял более 50% начальной активности после инкубирования в течение 24 ч при 60°C.

1. 6. 2. 4. Функции

Функции 2д лакказ мало изучены. Известно об участии 2д лакказ в морфогенезе и продукции пигментов.

Путём гомологичной рекомбинации был создан мутантный штамм *S. griseus*, не синтезирующий А-фактор («переключатель» для вторичного метаболизма и для морфологического развития). По сравнению с исходным штаммом, у мутантного отсутствовала *EpoA*-активность, также происходило снижение уровня синтеза меланина. К тому же, мутантный штамм не формировал воздушный мицелий. Внедрение гена *epoA* приводило к восстановлению окислительной активности, восстановлению исходного уровня синтеза меланина, а также восстановило способность штамма формировать воздушный мицелий (Endo *et al.*, 2002).

Также продемонстрировано участие 2д лакказ в процессах биодegradации лигноцеллюлозы в консорциуме с грибами (Lu *et al.*, 2014).

1. 6. 2. 5. Способы получения: индукция, суперэкспрессия

Известны примеры получения бактериальных 2д лакказ из природных продуцентов. С помощью оптимизации состава культуральной среды (замена глюкозы, как источника углерода, на мальтозу, и внесение ионов меди, как индуктора) удалось обеспечить приемлемый уровень продукции фермента *EpoA*, что позволило его очистить со сравнительно низким выходом – 0,3 мг белка (Endo *et al.*, 2002). Синтез *SilA* наблюдался при выращивании штамма на минимальной минеральной среде с добавлением галактоманнана и аспарагина (Molina-Guijarro *et al.*, 2009).

Обычно, для получения 2д лакказ используют методы молекулярной биологии (рис. 15). Наиболее простым способом является клонирование гена 2д лакказы с его последующей экспрессией. Доступность в базах данных последовательностей генов 2д лакказ позволяет подбирать праймеры непосредственно к целевому гену. Однако, если информации о последовательности гена нет в базах данных, используется гибридизация с последующей идентификацией участка ДНК, несущего целевой ген. Для клонирования гена *silA* были разработаны специфичные праймеры к N-концам и второму консервативному медь-связывающему участку известных последовательностей 2д лакказ *EpoA* и *SLAC*. Полученные ампликоны были использованы в качестве метки при Саузерн-блоттинге. Фрагмент ДНК *S. iprotocae*, обработанный рестриктазами, к которому специфически присоединилась метка, был идентифицирован. Определение нуклеотидной последовательности данного участка ДНК

указало на наличие гена 2д лакказы. В дальнейшем ген был клонирован и экспрессирован (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). При клонировании гена *epoA* использовался сходный подход. Однако в качестве метки для гибридизации использовалась известная последовательность гена SLAC (Endo *et al.*, 2002).

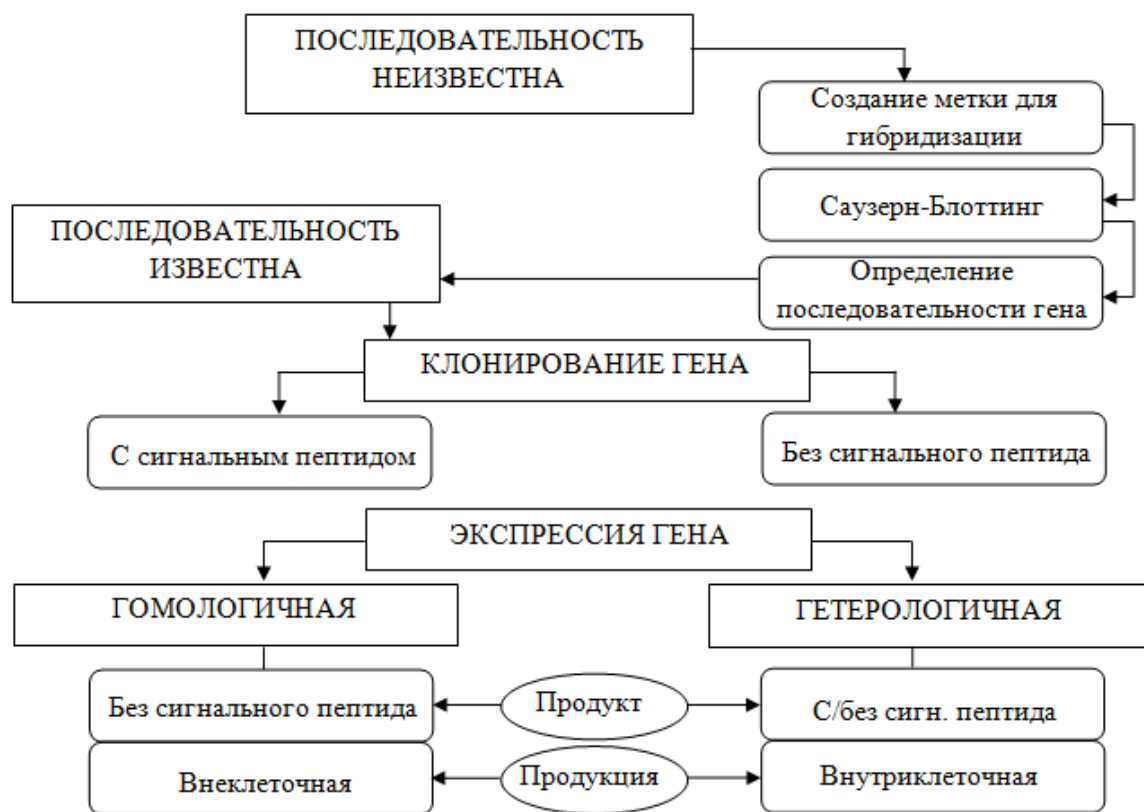


Рисунок 15. Общая схема получения 2д лакказ.

Клонирование генов 2д лакказ может осуществляться с последовательностью сигнального пептида или без него. Так, белки SilA, EpoA, и SLAC были клонированы с сигнальным пептидом, и для EpoA было показано, что каталитические свойства рекомбинантного фермента с сигнальным пептидом не отличались от таковых нативного. Белок MCO был получен без сигнального пептида. Белок Ssl1 был получен с сигнальным и без сигнального пептида, однако фермент Ssl1 с сигнальным пептидом оказался неактивным. Фермент LMSO был также получен с сигнальным и без сигнального пептида, однако LMSO без сигнального пептида был неактивен.

Экспрессия 2д лакказ может быть в гомологичной или гетерологичной системе. При экспрессии в гомологичной системе в качестве штамма-продуцента используется генетически модифицированный штамм-носитель целевого гена. В этом случае наблюдается внеклеточная продукция 2д лакказы. Примером может служить экспрессия 2д лакказы SLAC из *S. coelicolor*

A3(2), в *S. lividans* IAF10-164 (*msiK*⁻) – мутантном штамме без целлюлазной и ксиланазной активности. Преимуществом является высокий выход белка (350 мг/л) (Dube *et al.*, 2008). При экспрессии в гетерологичной системе, лакказа синтезируется в специально разработанном штамме-продуценте. Обычно для этой цели используются штаммы *E. coli*. Белок при этом не экспортируется через цитоплазматическую мембрану, не зависимо от того, был ли он клонирован с сигнальным пептидом или без него. В качестве продуцентов 2д лакказ использовались следующие штаммы *E. coli*: BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS(DE3), Transetta(DE3), Rosetta(DE3), TransB(DE3), BL21-CodonPlus(DE3)-RP. При экспрессии было Ssl1 показано, что наибольший выход белка (40-50 мг с литра среды) наблюдался при использовании штамма-продуцента BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Gunne and Urlacher, 2012). Однако он был в несколько раз ниже, чем при гомологичной экспрессии 2д лакказы SLAC.

При экспрессии 2д лакказ часто используется широко известный метод внедрения остатков гистидина на N- или C-конец белка. Для этого в последовательность одного из праймеров, обычно прямого, внедряют нуклеотиды, кодирующие так называемый гистидиновый «хвост», или же используется плаزمид, при экспрессии с которой к белку на N- или на C-конец «пришиваются» шесть остатков гистидина. Это позволяет проводить очистку лакказ в одну стадию с использованием аффинной хроматографии. Для клонирования 2д лакказ использовались следующие экспрессионные плазмиды: pET-20b(+) (SLAC – C-His-конец), pET-26b(+) (EpoA – C-His-конец), pET-28a(+) (SilA – N-His- и C-His-конец), pET22H (Ssl1– N-His-конец), pET-22b(+) (MCO – N-His- и C-His-конец), pQE-60 (LMCO – C- His-конец) (Endo *et al.*, 2003; Machczynski *et al.*, 2004; Molina-Guijarro *et al.*, 2009; Gunne and Urlacher, 2012; Ihssen *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2015).

1. 7. Каталитические свойства лакказ

Субстратная специфичность лакказ в значительной степени зависит от ОВП фермента (E_0). В соответствии с величиной ОВП, лакказы подразделяют на 3 группы: ферменты с низким ОВП (<460 мВ), со средним ОВП (>460 мВ и <710 мВ) и с высоким ОВП (>710 мВ). Лакказы бактерий и растений преимущественно обладают низким редокс-потенциалом, а лакказы грибов – средним и высоким. Лакказы высших грибов-базидиомицетов, как правило, представителей возбудителей т.н. «белой гнили» древесины чаще обладают высоким ОВП. Редокс-потенциал определяет окислительную способность фермента (Xu, 1997). Предполагается, что на редокс-потенциал лакказы оказывают влияние координационная сфера и структура T1-медного центра (Thurston, 1994, Xu *et al.*, 1998, Solomon *et at.*, 2004). Помимо

этого, такие факторы, как доступность растворителя, водородные связи, тип аксиального лиганда, а также расстояние между лигандами и атомом меди, могут оказывать влияние на редокс-потенциал атома меди T1-медного центра (Mot and Silaghi-Dumitrescu, 2012). Для ферментов с низким ОВП характерно наличие метионина в качестве аксиального лиганда T1-медного центра, со средним ОВП – лейцина, с высоким ОВП – фенилаланина (табл. 9).

Таблица 9.

Зависимость величины окислительно-восстановительного потенциала лакказы от характера аксиального лиганда (Mot and Silaghi-Dumitrescu, 2012).

Источник	E ⁰ (mV) vs. NHE	Аминокислотная последовательность лакказы	Номер в базе данных
<i>Trametes zonatus</i>	805 ± 5	⁸⁷ AAGS <u>S</u> FL... ⁴⁴⁹ GPWFL <u>H</u> CHIDFHLEAGFAV	PDB 2HZH
<i>Coriolopsis fulvocinerea</i>	800 ± 20	N.d.	–
<i>Trametes trogii</i>	790	¹⁰⁸ STGH <u>A</u> FL... ⁴⁴³ GPWFL <u>H</u> CHIDFHLEAGFAV	PDB 2HRH
<i>Trametes versicolor</i>	785	¹⁰⁸ SSGH <u>S</u> FL... ⁴⁷⁰ GPWFL <u>H</u> CHIDFHLEAGFAV	CAA77015.1
<i>Trametes hirsuta</i>	780 ± 10	¹⁰⁸ SPGH <u>S</u> FL... ⁴⁶⁵ GPWFL <u>H</u> CHIDFHLEGGFAV	AAL89554.2
<i>Trametes villosa</i>	780	¹¹⁰ ATGN <u>S</u> FL... ⁴⁷⁹ GPWFL <u>H</u> CHIDFHLEAGFAI	AAB47735.2
<i>Cerrena maxima</i>	750 ± 5	⁸⁷ SPGH <u>S</u> FL... ⁴⁴⁹ GPWFL <u>H</u> CHIDFHLEGGFAV	PDB 3DIV
<i>Trametes pubescens</i> lac. II	748 ± 5	¹⁰⁹ ATGN <u>S</u> FL... ⁴⁷⁸ GPWFL <u>H</u> CHIDFHLEAGFAI	UP Q8TG94
<i>Trametes pubescens</i> lac. I	746 ± 5	¹⁰⁸ SSGN <u>S</u> FL... ⁴⁷⁰ GPWFL <u>H</u> CHIDFHLEAGFAV	UP Q8TG93
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXC	740	¹⁰⁸ VPGH <u>S</u> FE... ⁴⁶⁴ GPWFL <u>H</u> CHIDWHL <u>D</u> LGFAV	UP B5MAF4
<i>Rigidoporus lignosus</i> B	730	¹⁰⁸ ASGN <u>S</u> FL... ⁴⁶⁵ GPWFL <u>H</u> CHIDWHL <u>E</u> AGFAV	UP Q6YA64
<i>Marasmius quercophilus</i> C30/I	730	¹¹¹ GH <u>A</u> FL... ⁴⁷⁰ <u>H</u> CHIDFHLEAG <u>F</u>	Ref. 14
<i>Rhizoctonia solani</i>	710	GP <u>A</u> FV... <u>H</u> CHIDFHLEAG <u>L</u>	Ref. 14
<i>Rigidoporus lignosus</i> D	700	⁸⁰ IPNE <u>S</u> FV... ⁴⁶⁶ GPWFL <u>H</u> CHIDWHL <u>E</u> AGLAV	PDB 1V10
<i>Trichoderma harzianum</i>	692	N.d.	–
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1b	650	¹⁰⁷ VPGH <u>S</u> FL... ⁴⁶⁷ GPWFL <u>H</u> CHVDWHL <u>D</u> LG <u>L</u> AV	UP O60199
<i>Basidiomycete</i> C30/II	560	¹¹³ GN <u>S</u> FL... ⁴⁷⁵ <u>H</u> CHIDFHLEAG <u>F</u>	Ref. 12
<i>Trichophyton rubrum</i>	540	¹³⁸ RPGE <u>S</u> YT... ⁵²¹ GPWFL <u>H</u> CHVDWHS <u>S</u> QGLAL	UP F2SL00
<i>Coprinus cinereus</i>	550	⁸⁷ SPGH <u>A</u> FL... ⁴⁵⁰ GPWFF <u>H</u> CHIEFHL <u>M</u> NGLAI	PDB 1HFU
<i>Scytalidium thermophilum</i>	510	... ⁵⁰⁶ <u>H</u> CHIDFHV <u>S</u> GG <u>L</u> ...	Ref. 12, 21
<i>Myceliophthora thermophila</i>	470	... ⁵⁰² <u>H</u> CHIDFHV <u>S</u> GG <u>L</u> ...	Ref. 12, 21
<i>Melanocarpus albomyces</i>	460	¹¹⁶ PPKGG <u>Q</u> R... ⁴⁹⁶ GAWLF <u>H</u> CHIAWHV <u>S</u> GG <u>L</u> SV	PDB 3FU7
<i>Bacillus subtilis</i> CotA	455	¹²⁸ QTGP <u>Y</u> FK... ⁴⁸⁵ GRYVW <u>H</u> CHILEHE <u>D</u> YD <u>M</u> MR	PDB 1GSK
<i>Streptomyces coelicolor</i> SLAC	430	³³ AKGI <u>T</u> AR... ²⁸¹ GAWMY <u>H</u> CHVQSHS <u>D</u> MGM <u>V</u> G	Q9XAL8
<i>Rhus vernicifera</i>	420	⁸² KPGT <u>N</u> FI... ⁴⁸⁹ GVWFL <u>H</u> CHFERHT <u>Z</u> EGMAT	BAB63411.2
<i>Escherichia coli</i> CueO	364	⁹¹ PPGG <u>K</u> RS... ⁴⁶⁵ HAYMA <u>H</u> CHLLEHE <u>D</u> TGM <u>M</u> L	PDB 2FQG

Консервативные гистидины и цистеин, а также аксиальные лиганды выделены подчёркиванием.

В одном случае, эксперимент по замене аксиального фенилаланина (Phe463) у лакказы из *T. villosa* на метионин или лейцин приводил к снижению редокс-потенциала T1-центра на 50 мВ и 110 мВ соответственно (Xu *et al.*, 1999). В другом случае, аксиальные лейцины в

структуре лакказ из штаммов *Rhizoctonia solani* (L470F) и *Myceliophthora thermophila* (L513F) были заменены на фенилаланин. Но у мутантных белков не наблюдалось увеличение редокс-потенциала T1-центра. Однако, модификация трипептида, образующего субстрат-связывающий канал T1-центра у лакказ из штаммов *R. solani* (L466V, E467S, A468G) и *M. thermophila* (V509L, S510E, G511A), привела к увеличению ОВП ферментов (Xu *et al.*, 1998). Таким образом, фенилаланин в аксиальном положении относительно атома меди T1-центра, а также гидрофобное микроокружение T1-медного центра (Matera *et al.*, 2008), могут быть основной причиной, определяющей высокий редокс-потенциал грибных лакказ.

Окислительно-восстановительный потенциал у 2д и 3д бактериальных лакказ значительно ниже, чем у грибных лакказ. Для 2д лакказ он составляет от 0,375 до 0,5 В (Machczynski *et al.*, 2004; Gallaway *et al.*, 2008; Gunne *et al.*, 2014). Величина ОВП 3д лакказы CotA из штамма *B. subtilis* составляла 0,455 В (Duraõ *et al.*, 2006). Анализ кинетических параметров 3д лакказ в отношении окисления нефенольных и фенольных субстратов выявляет более высокую скорость окисления и более высокое сродство ферментов к нефенольным субстратам (табл. 1). Таким образом, бактериальные лакказы относятся к группе низкопотенциальных ферментов. На этот факт также косвенно указывает наличие в качестве аксиального лиганда T1-медного центра аминокислоты метионина (табл. 9).

Для расширения спектра субстратов, окисляемых бактериальными лакказами, существует несколько подходов. Первый – использование медиаторов в паре с ферментом. Медиатор – соединение, которое окисляется лакказой и далее, независимо от фермента, окисляет целевой субстрат. В качестве медиаторов могут быть соединения различной структуры. Так, обычный субстрат лакказ АБТС может последовательно окисляться ферментом до катион-радикалов АБТС^{•+} и АБТС²⁺, чей редокс-потенциал может достигать 900 мВ и которые способны окислять нефенольные структуры лигнина (Bourbonnaise *et al.*, 1998). Одними из наиболее эффективных медиаторов является соединения, содержащие N-ОН группу: 1-гидроксibenзотриазол, виолуровая кислота. Редокс-потенциал окисленных интермедиатов этих соединений может достигать 1,0-1,1 В (Xu *et al.*, 2000). Медиаторами лакказ могут быть природные, в основном фенольные соединения, окисляемые лакказой до хинонов и фенокси-радикалов (Canas and Camarero, 2010). Однако ОВП таких природных медиаторов ниже, чем у синтетических (Johannes and Majcherczyk, 2000). Двухдоменные лакказы так же, как и трёхдоменные, способны окислять соединения с более высоким ОВП, чем собственный, в присутствии медиаторов. Например, сиреневый альдегид использовался для повышения ОВП лакказы SLAC из *S. coelicolor*. Фермент применялся для окисления красителя – индигокармина (динатриевая соль индиго-5,5'-дисульфокислоты), имеющего широкое применение в пищевой

промышленности и медицине. Без использования медиатора фермент окислял краситель с очень низкой эффективностью: степень обесцвечивания составляла 8% за один час. Применение медиатора позволяло повысить этот показатель до 85% (Dube *et al.*, 2008). Ещё один пример – это использование рекомбинантной лакказы SilA из *S. ipomoea* с медиатором для деколоризации красителя Orange II (4-[(2-гидрокси-1-нафтил)азо]бензенсульфоновой кислоты натриевая соль), используемого в пищевой промышленности и биологии (цитология, гистология). Без использования ацетосирингона (3',5'-диметокси-4'-гидроксиацетофенона) в качестве медиатора, лакказа не могла окислять Orange II. В паре с медиатором степень деколоризации составляла 90% после четырёх часов инкубации с красителем (снижение концентрации красителя с 50 мкМ до 5 мкМ) (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). Эффективные медиаторы 3д лакказ – 4-гидрокси-3,5-диметоксиацетофенон, АБТС, альдегид сиреневой кислоты, ванилин, *para*-гидроксibenзойная кислота, виолуровая кислота, гваякол, метил 3,5-диметокси-4-гидроксибензоат (Guan *et al.*, 2014, Lu *et al.*, 2012, 2013, Zhang *et al.*, 2012, Zheng *et al.*, 2012, Reiss *et al.*, 2011, Koschorreck *et al.*, 2009, Singh *et al.*, 2007, Arias *et al.*, 2003). Применение медиаторов для повышения ОВП оксидоредуктаз не ограничивается только лакказами. Так, известен пример повышения ОВП грибной лигнинолитической Mn-пероксидазы (Lisov *et al.*, 2004).

Второй подход – изменение аминокислотной последовательности белка с целью повышения его ОВП. В настоящее время используется большое количество методик для модификации лакказ с целью повышения термостабильности, окислительной способности (Mate and Alcalde, 2014). Для увеличения ОВП лакказы Ssl1 из *S. sviveus* использовался сайт-направленный мутагенез. Мутации затрагивали аминокислотное микроокружение T1-центра, а также аминокислоты, расположенные в большей отдалённости от него. В результате удалось повысить ОВП лакказы с 375 мВ до 391-456 мВ, что позволяло ферменту окислять 1,2-дигидроксиантрахинон-3-сульфоновую кислоту (Alizarin Red S) и индиго кармин более эффективно, чем исходному Ssl1, не подверженному модификации (Gunne *et al.*, 2014). Модификация аминокислотной последовательности белка CotA *B. subtilis* проводилась с целью повышения ОВП. Замена аксиального лиганда – метионина T1-центра на лейцин и фенилаланин приводила к повышению ОВП мутантных белков (на 100 мВ и 60 мВ, соответственно). Однако при этом наблюдалось снижение каталитической активности мутантных белков по сравнению с активностью исходного белка CotA (Duraõ *et al.*, 2006). Данный эффект был связан со снижением термодинамической стабильности мутантных белков за счёт внедрения более крупных аминокислотных остатков по сравнению с исходным метионином (Melo *et al.*, 2007). Сайт-направленный мутагенез был использован для

модификации последовательности лакказы из штамма *Bacillus* HR03 с целью повышения термостабильности белка (Mollania *et al.*, 2011). Замена глутаминовой кислоты в положении 188 на лизин, аргинин и глутамин привело к повышению термостабильности мутантных белков. Причём мутант Glu188Arg показал более высокое значение k_{cat} (трёхкратное увеличение) и низкое K_m (25%-ное снижение) в отношении окисления субстрата сирингальдазина. Более того, замещение аминокислоты Glu188 на неполярные аланин, изолейцин, лейцин и валин, или на положительно заряженные лизин и аргинин привело к повышению устойчивости лакказы к органическим растворителям, таким как метанол, этанол, пропанол (Rasekh *et al.*, 2014). Сочетание случайного и сайт-направленного мутагенеза эффективно использовалось для получения двойного мутанта лакказы CotA *Bacillus licheniformis* (Koschorreck *et al.*, 2009). Двойная мутация с заменой лизина на аспарагин в положении 316 и аспарагиновой кислоты на глицин в положении 500 приводила к увеличению выхода белка в процессе экспрессии с 26 мг до 291 мг белка с литра среды, а также способствовала повышению активности мутантной лакказы в отношении феруловой кислоты.

1. 8. Применение лакказ

Лакказы имеют свойства, делающие их привлекательными для применения в различных направлениях биотехнологии. Это сочетание таких качеств, как высокая окислительная способность, широкая субстратная специфичность, стабильность, отсутствие потребности в специальных кофакторах, возможность использования медиаторов, возможность изменения характеристик фермента при его иммобилизации (Hassani *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2014).

Пищевая промышленность. Лакказы используются при производстве вин, фруктовых соков и пива для осветления вследствие удаления полифенольных соединений (Minussi *et al.*, 2002; Osma *et al.*, 2010). При производстве пива лакказы используются также для удаления кислорода из готового продукта, что приводит к увеличению срока хранения последнего (Mathiasen, 1995). При производстве соков возможно использование лакказы как отдельно (Gassara-Chatti *et al.*, 2013), так и в комплексе с ультрафильтрацией, для получения осветлённого продукта без примесей фенолов (Maier *et al.*, 1990; Ritter *et al.*, 1992; Stutz, 1993). Лакказу используют для подготовки пробок из натурального сырья для закупорки винных бутылок (Conrad *et al.*, 2000). Лакказа может быть использована при производстве хлебобулочных изделий. Применение фермента способствует увеличению прочности и снижению липкости теста, что улучшает его обрабатываемость, к тому же у готового изделия улучшаются пышность и мягкость мякиша (Si, 1994; Labat *et al.*, 2000). Как антиоксидант,

лакказа может использоваться для увеличения срока хранения масла (Глухов и Леонтьевский, 2010).

Биосенсоры. Так как лакказы способны катализировать реакцию, сопряжённую с переносом электронов без дополнительных кофакторов, они стали удобным элементом в составе биосенсоров. Биосенсоры на основе лакказы способны детектировать различные фенольные соединения, кислород или азиды (Couto and Herrera, 2006). На основе тирозиназы и лакказы *Trametes versicolor* был разработан биосенсор, детектирующий присутствие SO₂ в винах и сусле (MonteREALI *et al.*, 2010). Также на основе лакказ *T. versicolor* и *T. hirsuta* были разработаны биосенсоры для определения содержания фенолов в винах и чае (Di Fusco *et al.*, 2010, Ibarra-Escutia *et al.*, 2010). На основе лакказ были созданы биосенсоры морфина, кодеина (Bauer *et al.*, 1999), катехоламина (Lisdat *et al.*, 1997; Leite *et al.*, 2003; Ferry and Leech, 2005), растительных флавоноидов (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2004), а также для электроиммуноанализа (Kuznetsov *et al.*, 2001).

Текстильная промышленность. В текстильной промышленности используется большое количество красителей органической и неорганической природы. Химическая структура красителей обеспечивает им устойчивость к выцветанию под воздействием света, воды и других химических соединений. Лакказы обладают способностью деградировать различные красители, обеспечивая детоксификацию сточных вод на производстве (Abadulla *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2004; Dominguez *et al.*, 2005; Kunamneni *et al.*, 2008a; Kunamneni *et al.*, 2008b; Koschorreck *et al.*, 2009; Башилова *и др.*, 2000). Например, у штамма-продуцента лакказы *T. versicolour* была выявлена способность деградировать металлсодержащий краситель Grey Lanaset G. Степень деколоризации составила 90% (Blanquez *et al.*, 2004). Лакказа *T. versicolour* была способна полностью обесцвечивать такие красители, как Amaranth, Tropaeolin O, Reactive Blue 15, Congo Red, and Reactive Black 5, степень снижения токсичности красителей при этом различалась и зависела от типа красителя (Ramsay and Nguyen, 2002).

Важное значение для текстильной промышленности имеет способность лакказ отбеливать синтетические волокна и волокна растительного происхождения. В случае синтетических волокон происходит разложение лакказой или парой лакказа/медиатор окрашивающих соединений (Pezzella *et al.*, 2015), в случае натуральных волокон производится делигнификация растительных волокон, например, льна, хлопка (Башилова *и др.*, 2000; Spina *et al.*, 2016).

Кроме того, обработка лакказой готовых тканей улучшает качество их поверхности (Dong *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016)

Производство косметики. Краска для волос с использованием лакказы как окислителя окрашивающих субстратов исключает использование пероксида водорода, который может оказывать сильный раздражающий эффект на кожные покровы (Otsuka Saito *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2014). К тому же было показано, что использование смесей природных фенолов, которые были получены из растительного сырья, такого как лигнин или танин, позволяет расширять цветовую гамму конечного продукта полимеризации. Это позволяет значительно увеличить цветовую палитру продуктов косметической промышленности (Kim *et al.*, 2007).

Целлюлозно-бумажная промышленность. При производстве бумаги необходимо удалять лигнин из бумажной массы. Для разрушения лигнина используется кислотная и щелочная варка с последующей обработкой хлорсодержащими реагентами или озоном. Использование лакказы в паре с медиатором позволяет избегать неэкологичного производства, не требует высоких финансовых и энергозатрат (Couto and Herrera, 2006).

Биоремедиация. Использование в современном мире большого количества пестицидов и других продуктов химической промышленности приводит к сильному загрязнению почвы, воды и воздуха. Такие соединения, как полихлорированный бифенил, полициклические ароматические углеводороды, 1,1,1-трихлор-2,2-бис (4-хлорфенил) этан (ДДТ) и др. известны своим канцерогенным действием, а также высокой устойчивостью к разрушению в окружающей среде (Shraddha *et al.*, 2011). Лакказы используются в биоремедиационных целях и эффективно разрушают устойчивые соединения различной природы (Ahn *et al.*, 2002; Keum and Li, 2004; Udayasoorian and Prabu, 2005).

Химический синтез. Известно, что при окислении лакказами фенольных соединений формируются активные радикалы, которые могут вступать в реакции ди-, олиго-, и полимеризации. Фенольные радикалы могут димеризоваться с образованием С–О и С–С связей. Это свойство использовали для синтеза производных природных соединений, таких как пенициллин X (Agematu *et al.*, 1993), бисфенол А (Uchida *et al.*, 2001) и других антибиотиков (Wilkinson and Bachmann, 2006; Mikolasch *et al.*, 2008). Лакказы используются для получения противоопухолевых препаратов (актиноцин, винбластин), иммунодепрессантов (циклоспорин А), гормонов (эстрадиол), фитоалексинов (ресвератрол) (Kunamneni *et al.*, 2008a), противовирусных препаратов (Лисов *и др.*, 2013). Также – в синтезе производных различных аминокислот (L-триптофана, L-фенилаланина, L-лизина) (Mogharabi and Faramarzi, 2014).

Лаккокрасочная промышленность. Показано участие системы лакказа-медиатор в сушке алкидных смол. Окисление ненасыщенных жирных кислот в структуре краски способствует формированию пероксидной сшивки и полимеризации конечного продукта реакции (Greimel *et al.*, 2013).

Производство биотоплива. Лигноцеллюлоза является одним из наиболее перспективных видов сырья для производства современных видов биотоплива. Лакказы, с одной стороны, используются для предварительной обработки материала: для удаления или модификации лигнина в исходной лигноцеллюлозной биомассе (Chen *et al.*, 2012б). Это способствует высвобождению и эффективному гидролизу полисахаридов. С другой стороны, лакказа может быть использована для устранения ингибиторов, формирующихся в реакционной среде в ходе технологического процесса. Обычно ингибиторами в таких условиях являются фенолы (Kudanga and Le Roes-Hill, 2014).

Биомедицинская индустрия. Помимо использования лакказ для синтеза биологически-активных препаратов, фермент используется для диагностики заболеваний. Полимеры (гидрогели на основе пептидогликана и целлюлозы), позволяют обнаруживать потенциально патогенные микроорганизмы. Такие системы реагируют на внеклеточные ферменты патогенов, или на ферменты, образуемые иммунной системой человека в ответ на инфекцию. Включение лакказы в структуру биополимеров приводило к повышению стабильности последних и возрастанию интенсивности сигнала в случае детекции инфекции (Schneider *et al.*, 2012). Известна разработка диагностического подхода для определения билирубина в биологических жидкостях человека на основе бактериальной лакказы (Глухов и др., 2011).

Моющие средства. Известен ряд патентов, защищающих рецептуры моющих средств с лакказами или парой лакказа/медиатор в их составе (Gualco and Johnston, 2004).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы, ферменты, коммерческие наборы

Реактивы, ферменты.

Диа-М, Россия: дрожжевой экстракт, азид натрия, бычий сывороточный альбумин (БСА), соевая мука. ЗАО «Экос-1», Россия: изопропанол, серная кислота. «Компонент реактив», Россия: уксусная кислота. ОАО «Синтез», Россия: ампициллина натриевая соль, канамицина сульфат, стрептомицина сульфат. ООО «Реахимкомпонент», Россия: гидрофосфат калия, дигидрофосфат калия. Реахим, Россия: этанол, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, гидроксид натрия, кальция хлорид, глюкоза, магния сульфат семиводный, меди сульфат пятиводный, натрия молибдат, цинка сульфат, нитрат аммония, сульфат алюминия-калия, сульфат кобальта семиводный. «Сигма Тек», Россия: соляная кислота. «Химпром», Россия: хлороформ. Химреактив, Россия: марганца сульфат одноводный, железа сульфат семиводный, Aldrich, США: нитрилоацетат. Amresco, США: бакто-триптон. AppliChem, Германия: АБТС, бромистый этидий. Difco, США: агар-агар, бакто-пептон. Helicon, Россия: натрия хлорид, лизоцим, трис(гидроксиметил)аминометана (Трис). Lachema, Россия: агароза для электрофореза. Panreac, Германия: глицерин, борная кислота, сульфат меди безводный. Serva, Германия: акриламид, этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль, L-тирозин, додецилсульфат натрия, N,N'-метилен-бисакриламид, тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД). SibEnzyme, Россия: *Taq* ДНК-полимераза. Sigma Aldrich, США: 2,6-ДМФ, феруловая кислота, 4-метоксифенол, ванильная кислота, гентизиновая кислота, гидрохинон, катехол, пирогаллол, сиреневая кислота, ферроцианид калия, бриллиантовый зелёный, малахитовый зелёный, фуксин, изопропилтиогалактозид (ИПТГ), агароза легкоплавкая, реактив Брэдфорд, бромфеноловый синий. Thermo Scientific, Литва: эндонуклеазы рестрикции BamHI, HindIII, T4 ДНК-лигаза, дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ, персульфат аммония, 5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозид (X-Gal).

Буферные растворы и реакционные смеси.

Буферные растворы для электрофореза в агарозном геле: 1) ТВЕ: 89 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 0,89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА-Na; 2) 6× для нанесения на гель образцов ДНК: 0,25% бромфеноловый синий, 30 % глицерин; 3) ТЕ для растворения ДНК: 10 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА-Na.

Состав буферных растворов для электрофореза в полиакриламидном геле: 1) концентрирующий гель: 4% акриламид-метиленбисакриламид; 0,125 М Трис-НСl, рН 6,8; 0,1% ДДС-На; 0,075% ТЕМЕД; 0,1% персульфат аммония; 2) разделяющего гель: 12% акриламид-метиленбисакриламид; 0,375 М Трис-НСl, рН 8,8; 0,1% ДДС-На; 0,085% ТЕМЕД, 0,114% персульфат аммония; 3) электродный буфер (рН 8,3): 0,025 М Трис; 0,192 М глицин; 0,1% ДДС-На; 4) буфер для образцов: 0,0625 М Трис-НСl, рН 6,8; 2% ДДС-На; 10% глицерин; 5% β -меркаптоэтанол; 0,04% бромфеноловый синий.

Буфер Britton and Robinson: 0,05 М борная кислота, 0,05 М ортофосфорная кислота, 0,05 М уксусная кислота (Britton and Robinson, 1931). Требуемое значение рН получали титрованием 1 М NaOH. Физиологический раствор: 0,9% NaCl.

Буферы для колонки HisTrapTMFF: 1) буфер 1: 20 мМ натрий-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, 1 мМ имидазол, рН 7,4; 2) буфер 2: 20 мМ натрий-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, 10 мМ имидазол, рН 7,4; 3) буфер 3: 20 мМ натрий-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, 500 мМ имидазол, рН 7,4. Буфер для колонки Superdex 200: 20 мМ натрий-ацетатный буфер, 0,1 М NaCl, рН 5,0.

Препараты ДНК. Плазмида рAL-ТА для быстрого клонирования (Евроген, Россия). Плазмида рQE-30 экспрессионная (Qiagen, Германия). Маркеры молекулярного веса ДНК: HyperLadder I, HyperLadder IV (Bioline, Германия), MassRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific, Литва), MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, Литва).

Набор для выделения геномной ДНК: Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва). Наборы для выделения ДНК из агарозных гелей: DNA Extraction Kit (Thermo Scientific, Литва), Invisorb (Invitek, Германия). Набор для выделения плазмид: Plasmid Midiprep Kit (Bio-Rad, США).

Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные в работе, представлены в таблицах 10, 11 и 12.

Таблица 10.

Олигодезоксирибонуклеотиды для клонирования генов.

Штамм	Название	Нуклеотидная последовательность (направление 5' – 3')
<i>Streptomyces</i> sp. (<i>lividans</i>) Ac-235, Ac-1709	S.livF S.livR	ATGGACAGGCGAGGCTTCAA TCAGTGCTCGTGTTCTGTG
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Ac-629	S.virF S.virR	ATGGACAGACGCAGCTTCAA CGTCAGTGCTCGTGGCC
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> Ac-831	S.hrF S.hrR	ATGCCAGACGCGGCTTCAG GCGCACGAGCTATGACCC
<i>Streptomyces griseoflavus</i> Ac-993	S.gfF S.gfR	ATGGACAGACGCGGTTTCAA TCAGTGCGCGTGCTCCTGGC

Таблица 11.

Олигодезоксирибонуклеотиды для экспрессии генов с сигнальным пептидом.

Штамм	Название	Нуклеотидная последовательность (направление 5' – 3')
<i>Streptomyces</i> sp. (<i>lividans</i>) Ac-1709	S.livFe S.livRe	AGTGGATCCATGGACAGGCGAGGCTTCAA TCAAAGCTTTCAGTGCTCGTGTTCGTGTG
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Ac-629	S.virFe S.virRe	AGTGGATCCATGGACAGACGCAGCTTCAA TCAAAGCTTTCAGTGCTCGTGGCC
<i>Streptomyces griseoflavus</i> Ac-993	S.gfFe S.gfRe	ATGGGATCCATGGACAGACGCGGTTTCAA TCAAAGCTTTCAGTGCGCGTGTCTCCTGGC

Таблица 12.

Олигодезоксирибонуклеотиды для экспрессии генов без сигнального пептида.

Штамм	Название	Нуклеотидная последовательность (направление 5' – 3')
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Ac-629	S.virFenS	AGTGGATCCGCCGCACCGGCCAGGAC
<i>Streptomyces griseoflavus</i> Ac-993	S.gfFenS3	AGTGGATCCGCCGGGGCGGCGCCCG

2.1.2. Состав сред для культивирования бактерий

Среды для культивирования E. coli. Среда LB: 1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl. Среду доводили NaOH до pH 7,0. Среда могла содержать селективные антибиотики с конечной концентрацией: ампициллин – 100 мкг/мл, канамицин – 25 мкг/мл, стрептомицин – 50 мкг/мл. Агаризованная среда LB (LB-агар) имела в составе дополнительно 1,5% бакто-агар. Значение pH (7,0) доводили перед добавлением агара.

Среды для культивирования стрептомицетов. Среда «овсянка» (г/л): 30 г овсяных хлопьев, 20 г агара. Пептонно-дрожжевая среда (г/л): пептон – 5, дрожжевой экстракт – 3, КН₂РО₄ – 0,2, глюкоза – 5, агар – 20. Среда для определения активности лакказы (г/л): КН₂РО₄ – 1, К₂НРО₄ – 4, NaCl – 0,2, MgSO₄ – 0,2, NH₄NO₃ – 1, пептон – 5, соевая мука – 10, микроэлементы – 0,5 мл. Состав раствора микроэлементов (г/л): нитрилоацетат – 1,5; MgSO₄ × 7H₂O – 3,0; MnSO₄ × H₂O – 0,5; NaCl – 1,0; FeSO₄ × 7 H₂O – 0,1; CoSO₄ × 7 H₂O – 0,1; CaCl₂ – 0,082; ZnSO₄ – 0,1; CuSO₄ × 5H₂O – 0,01; AlK(SO₄)₂ – 0,01; H₃BO₃ – 0,01; NaMoO₄ – 0,01.

2.1.3. Бактериальные штаммы

В работе использовали штаммы бактерий из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ): *Streptomyces griseoflavus* Ac-993 ((Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948),

Streptomyces sp. Ac-1709 (*Streptomyces lividans* (Krassinikov et al. 1965) Pridham 1970, *Actinomyces lividans* Krassinikov et al. 1965), *Streptomyces* sp. Ac-235 (*Streptomyces lividans* (Krassinikov et al. 1965) Pridham 1970, *Actinomyces lividans* Krassinikov et al. 1965), *Streptomyces viridochromogenes* Ac-629 type strain ((Krainsky 1914) Waksman et Henrici 1948), *Streptomyces hygroscopicus* Ac-831 ((Jensen 1931) Waksman and Henrici 1948 subsp. *hygroscopicus*). Кроме того, использовали штаммы *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen, США), M15 [pREP4] (Qiagen, Германия).

2.1.4. Оборудование, программы, интернет ресурсы

Оборудование. Источник питания Эльф-4 (ДНК-технология, Россия), аппарат для электрофореза Mini-Sub Cell GT System (Bio-Rad, США), программируемый ДНК-амплификатор MJ Mini (Bio-Rad, США), система гель-документирования: камера CF 20 DXC Air, модуль ACC1 (Kappa messtechnik, Германия), спектрофотометр UV-1650 PC (Shimadzu, Япония), центрифуга настольная CM-50 (Elmi, Латвия); напольная K-23 (Janetzki, Германия); J2-21 (Beckman, США), ультрафиолетовый транс-иллюминатор TCP-20.LC (Vilber Lourmat, Франция), термостатируемая водяная баня TW-2.02 (Elmi, Латвия), термостат «Термит» (ДНК-технология, Россия), шейкер V-3 (Elmi, Латвия), pH-метр pH-410 (Аквилон, Россия), настольные весы: RV 153, DV 114C, ARA 520 (Ohaus, Китай), магнитная мешалка MSH-300 (Biosan, Латвия), шейкер-инкубатор Excella E25 (New Brunswick Scientific, Германия), АКТА FPLS (Amersham biosciences, США), дезинтегратор Soniprep 150 Plus (MSE, Великобритания). Аппарат для электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) Mini-Protean (Bio-Rad, США), источника тока ECPS 3000/150 (Pharmacia, Швеция).

Компьютерные программы и интернет ресурсы. Программы для работы с последовательностями ДНК и белков GeneRunner 3.05 (Hastings Software Inc., США), Vector NTI (Life Technologies, США), BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), программа для сохранения изображения DX-Camera Control 1,1b (Kappa messtechnik, Германия).

База данных нуклеотидных последовательностей NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), сервис сравнения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей Multiple Sequence Alignment Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Программа для определения наличия сигнального пептида SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), программа для анализа доменной структуры белков InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). Программа для визуализации структур лакказ PyMOL (<http://www.pymol.org>).

2.2. Методы

2.2.1. Клонирование генов медьсодержащих оксидаз

Получение биомассы для выделения геномной ДНК. Штаммы бактерий рода *Streptomyces* (Ас-1709, Ас-629, Ас-235, Ас-993 и Ас-831), полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов, поддерживались в пробирках со скошенным агаром со средой «овсянка». Для получения биомассы со скошенного агара проводили смыв бактериальных клеток физиологическим раствором. 1 мл Суспензии клеток инокулировали в 750 мл колбы, содержащие 200 мл пептонно-дрожжевой среды. Рост биомассы осуществлялся 6 суток при температуре 28°C и непрерывном перемешивании (180-200 об/мин). Полученную биомассу центрифугировали в течение 20 мин при 5000 об/мин, супернатант сливали, осаждённую биомассу замораживали при -20°C и в дальнейшем использовали для выделения геномной ДНК.

Выделение геномной ДНК. Геномную ДНК штаммов Ас-1709, Ас-629, Ас-235, Ас-993 и Ас-831 выделяли при помощи коммерческого набора Genomic DNA Purification Kit. К 10-20 мг бактериальной массы, предварительно разрушенной в жидком азоте с использованием ступки и пестика, добавляли 400 мкл лизирующего буфера и инкубировали 20 мин при 65°C. Затем вносили 600 мкл хлороформа, перемешивали 5 раз и центрифугировали (2 мин, 12000 g). Супернатант переносили в новый эппендорф, добавляли 800 мкл 1X буфера для преципитации, и центрифугировали (4 мин, 16000 g). Полученный осадок растворяли в 100 мкл раствора NaCl, добавляли 300 мкл ледяного этанола, давали ДНК осесть (-20°C, 1 ч) и центрифугировали (5 мин, 15000 g). Полученный осадок промывали 1 раз 70% этанолом, высушивали (10 мин, 37°C) и растворяли в 100 мкл деионизованной воды или в TE-буфере. Эффективность выделения геномной ДНК определяли электрофоретически в 0,8% агарозном геле с бромистым этидием (0,05%).

Постановка ПЦР-амплификации. ПЦР-амплификацию ДНК проводили в смесях для ПЦР с добавлением олигонуклеотидов для клонирования генов (2,5 мкМ каждого) (табл. 10), дезоксинуклеотидов в конечной концентрации 250 мкМ, MgCl₂ (1,25-1,5 мМ) и матрицы ДНК (2,5 мкг/мл) согласно следующим режимам (табл. 13).

Таблица 13.

Режимы, использованные в ПЦР-амплификации

Целевой штамм	Условия ПЦР-амплификации					Количество циклов
	Первичная денатурация	Денатурация	Отжиг	Элонгация	Конечная элонгация	
Ас-1709 Ас-235	95°C 3 мин	95°C 30 сек	62°C 30 сек	72°C 30 сек	72°C 1,5 мин	30
Ас-629	95°C 5 мин	95°C 30 сек	64°C 30 сек	72°C 45 сек	72°C 1,5 мин	36
Ас-831	95°C 5 мин	95°C 30 сек	61°C 30 сек	72°C 45 сек	72°C 2 мин	36
Ас-993	-	98°C 10сек	50, 54, 58, 60, 62, 64, 65 °C 15 сек	72°C 3,5 мин	-	35

Очистка фрагментов ПЦР с помощью препаративного электрофореза. Продукты ПЦР в препаративных количествах разделяли электрофорезом в 1% геле легкоплавкой агарозы в буфере TBE. В качестве красителя использовали бромистый этидий 0,05%, что позволяло детектировать полосы ДНК при облучении ультрафиолетовым светом. Участок геля с полосой ДНК нужного размера вырезали с помощью скальпеля, помещали в пластиковую пробирку. Выделение и очистку ДНК проводили с использованием коммерческого набора DNA Extraction Kit согласно инструкции производителя. Эффективность выделения, а также концентрацию полученных фрагментов ДНК анализировали электрофоретически.

Лигирование фрагментов ПЦР и вектора pAL-TA. Реакция лигирования проводилась согласно протоколу Thermo Scientific для T4-DNA лигазы. Реакционную смесь объёмом 20 мкл инкубировали при 22°C 16 ч. Для инактивации фермента реакцию инкубировали 10 мин при 65°C. Полученный препарат использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* DH10B.

Получение компетентных клеток E.coli. Химически компетентные клетки *E. coli* для трансформации температурным шоком получали согласно методу с использованием CaCl₂ с концентрацией 100 мМ. Для этого инокулировали 1-2 колониями клеток 5 мл среды LB с необходимым антибиотиком. После культивирования 16 ч инокулят в объёме 1 мл вносили в 100 мл LB-среды с антибиотиком и подращивали культуру клеток 3 ч при 37°C и непрерывном перемешивании (200 об/мин) до оптической плотности 0,5 ед. при 600 нм. После охлаждения на лёду в течение 10 мин, клетки осаждали центрифугированием (4100 об/мин, 4°C, 10 мин). Полученный осадок ресуспендировали в 30 мл ледяного CaCl₂ (100 мМ), выдерживали на льду

10 мин, затем снова центрифугировали (4100 об/мин, 4°C, 10 мин). Осадок ресуспендировали в 2 мл CaCl₂ (100 мМ), вносили глицерин до конечной концентрации 20%, переносили аликвоты по 200 мкл в криоустойчивые пробирки и помещали клетки на -70°C для хранения.

Трансформация компетентных клеток E. coli. Для трансформации с использованием теплового шока лигазную смесь в объеме 5 мкл добавляли к 200 мкл CaCl₂-компетентных клеток *E. coli* DH10В и инкубировали на льду в течение 30 мин. После теплового шока (42°C, 90 с) пробирки охлаждали на льду 1-2 мин, после чего вносили 800 мкл среды LB, инкубировали (45 мин, 37°C) и высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин и стрептомицин, необходимые для селекции.

Отбор и скрининг клонов. Идентификация и отбор трансформантов *E. coli* со вставкой осуществлялись на основе «сине-белой селекции» с использованием антибиотиков в качестве индикаторов наличия плазмиды, а также IPTG и X-Gal в качестве индикаторов наличия вставки в плазмиде. Скрининг клонов на наличие необходимой вставки проводили с использованием ПЦР. Для этого стерильным наконечником для автоматических пипеток отбирали биомассу (0,5-2,0 мкл) из колонии на чашке Петри. Биомассу переносили в пробирку для ПЦР, заполненную 20 мкл реакционной смеси для ПЦР. Для скрининга рекомбинантных клонов использовали олигонуклеотиды для клонирования генов (табл. 10). ПЦР-амплификацию проводили с использованием оптимального режима в случае с каждой парой праймеров. Анализ продуктов ПЦР проводили электрофорезом в 1% геле агарозы.

Выделение плазмидной ДНК из E. coli. Отдельную колонию *E. coli* со вставкой вносили в 5 мл среды LB и выращивали в течение ночи при постоянном перемешивании и температуре 37°C. Полученную биомассу осаждали центрифугированием (1 мин, 12000 g) и использовали для выделения плазмид. В качестве экспресс-метода получения чистых препаратов плазмидной ДНК, пригодных для секвенирования, использовали набор реактивов для мидипрепаративного выделения плазмидной ДНК (Plasmid Midiprep Kit). Нуклеотидная последовательность клонированных генов медьсодержащих оксидаз подтверждалась секвенированием.

2.2.2. Экспрессия генов медьсодержащих оксидаз в *E. coli*

Постановка ПЦР-амплификации с праймерами для клонирования генов в экспрессионный вектор. ПЦР-амплификацию генов проводили в смесях для ПЦР с добавлением

олигонуклеотидов для экспрессии генов (2,5 мкМ каждого) и плазмид с целевым геном-вставкой в качестве матрицы ДНК (2,5 мкг/мл) согласно следующим режимам (табл. 14).

Таблица 14.

Режимы, использованные в ПЦР-амплификации.

Целевой ген	Условия ПЦР-амплификации					Количество циклов
	Первичная денатурация	Денатурация	Отжиг	Элонгация	Конечная элонгация	
Ac-1709	95°C 3 мин	95°C 30 сек	62°C 30 сек	72°C 30 сек	72°C 1,5 мин	30
Ac-629	95°C 5 мин	95°C 30 сек	64°C 30 сек	72°C 45 сек	72°C 1,5 мин	36
Ac-993	-	98°C 10сек	50, 54, 58, 60, 62, 64, 65 °C 15 сек	72°C 3,5 мин	-	35

Обработка эндонуклеазами рестрикции и лигирование генов и вектора pQE-30. Гены медьсодержащих оксидаз были наработаны с использованием праймеров для клонирования генов в экспрессионный вектор, как описано выше. Обработка ПЦР-ампиконов и вектора pQE-30 эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII проводилась согласно инструкции производителей. Реакционные смеси инкубировали 2 ч при 37°C, после чего ферменты были инактивировали при 80°C в течение 20 мин. Фрагменты ДНК и вектор, обработанные рестриктазами, использовали для постановки реакции лигирования. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* M15(pRep4).

Трансформация, скрининг клонов. Для трансформации лигазную смесь в объеме 5 мкл добавляли к 100 мкл CaCl₂-компетентных клеток *E. coli* M15(pRep4) и инкубировали на льду в течение 30 мин. После теплового шока (42°C, 90 с) пробирки охлаждали на льду 1-2 мин, после чего вносили 400 мкл среды LB, инкубировали (40 мин, 37°C) и высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин и канамицин, необходимые для селекции. Идентификация клонов со вставкой осуществлялась на основе ПЦР. Из колоний со вставками была выделена рекомбинантная плазмидная ДНК. Нуклеотидная последовательность клонированных генов подтверждалась секвенированием.

Экспрессия лакказных генов. Рекомбинантными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* M15(pRep4). Отдельную колонию *E. coli* вносили в 5 мл среды LB с ампициллином и канамицином и выращивали в течение ночи при постоянном перемешивании (150 об/мин) и

температуре 37°C. Полученную биомассу объемом 50 мкл инокулировали в 5 мл среды LB с ампициллином и канамицином и выращивали при 37°C 3 часов. Экспрессию генов лакказ индуцировали добавлением 1 mM ИПТГ. Клетки выращивали в течение 3 ч при постоянном перемешивании (150 об/мин) и температуре 37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием (1 мин, 13000 g), ресуспендировали в 20 мкл деионизованной воды, вносили 20 мкл буфера для нанесения образцов для белкового электрофореза и кипятили пробы 5 мин. После этого анализировали индукцию синтеза белка по электрофореграмме.

Условия наработки лакказ в штамме E. coli. Отдельную колонию *E.coli* M15(Rep4), трансформированную плазмидой со вставкой-геном из штамма Ac-1709, вносили в 5 мл среды LB с ампициллином и канамицином. Выращивали в течение ночи при постоянном перемешивании (150 об/мин) и температуре 37°C. Полученную биомассу объемом 4 мл инокулировали в 200 мл среды LB с ампициллином и канамицином и выращивали при 37°C 3 ч (до достижения оптической плотности 0,3-0,4). Начальная оптическая плотность составляла 0,04-0,05 при 600 нм. Затем в культуральную среду вносили ИПТГ до конечной концентрации 1 mM и CuSO₄ до конечной концентрации 0,25 mM и выращивали в течение 6 часов: первый час – при постоянном перемешивании и температуре 37°C, остальные 5 ч – без перемешивания при той же температуре. После этого биомассу центрифугировали (30 мин, 4°C, 4200 об/мин), супернатант удаляли, а биомассу ресуспендировали в 5 мл буфера 1. Клетки разрушали ультразвуком, супернатант фильтровали (Whatman GD/X, диаметр пор 0,2 мкм) и использовали для получения рекомбинантного белка.

Отдельные колонии *E. coli* M15(Rep4), трансформированные плазмидами со вставками-генами из штаммов Ac-629 и Ac-993, вносили в 5 мл среды LB с ампициллином и канамицином. Выращивали в течение ночи при постоянном перемешивании (150 об/мин) и температуре 37°C. Полученную биомассу объемом 4 мл инокулировали в 200 мл среды LB с ампициллином и канамицином и выращивали при 37°C 3 ч до оптической плотности 0,3-0,4 при 600 нм (начальная оптическая плотность при 600 нм составляла 0,04-0,05). Затем в культуральную среду вносили ИПТГ до конечной концентрации 0,1 mM и CuSO₄ до конечной концентрации 0,25 mM и выращивали в течение 17 ч при постоянном перемешивании (50 об/мин) и температуре 18°C, биомассу центрифугировали (30 мин, 4°C, 4200 об/мин), супернатант удаляли, а биомассу ресуспендировали в 5 мл буфера 1 (п. 2.1.1.). Клетки разрушали ультразвуком, супернатант фильтровали (Whatman GD/X, диаметр пор 0,2 мкм) и использовали для нанесения на колонку.

2.2.3. Очистка рекомбинантных белков

Для очистки рекомбинантных белков использовали колонку с Ni-NTA сефарозой, объемом 5 мл (HisTrapTMFF). Колонка уравнивалась пятью объемами буфера 1. На колонку наносили клеточный экстракт, содержащий рекомбинантный белок, со скоростью 1 мл/мин. Затем колонку промывали пятью объемами буфера 1 для удаления неспецифически связанного белка. Элюцию лакказы с колонки проводили ступенчатым градиентом имидазола (буфер 2, буфер 3), скорость элюции составляла 1 мл/мин, объем фракций 2 мл. Активные фракции объединялись и использовались для нанесения на колонку HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare). Колонку уравнивали буфером 4, в качестве элюента использовали тот же буфер. Скорость потока составляла 1 мл/мин, фракционирование по 2 мл. Фракции с рекомбинантным белком объединяли, диализовали в буфере 4 без NaCl и хранили при -20°C.

2.2.4. Характеристика ферментов

Электрофорез в полиакриламидном геле. Денатурирующий диск-электрофорез очищенных медьсодержащих оксидаз проводили по методу Laemmly (Laemmly, 1970) с 0,1% ДДС-Na в 12% ПААГ с помощью аппарата Mini-Protean (Bio-Rad, США) и источника тока ECPS 3000/150 (Pharmacia, Швеция). Режим электрофореза: 90 мА, стабилизация по току при толщине геля 1 мм.

Пробы, содержавшие белок, перед нанесением смешивали с двумя объемами буфера для образцов и кипятили на водяной бане в течение 5 мин. Белковые полосы проявляли по Fairbanks (Fairbanks *et al.*, 1971). Окрашивание проводили с помощью красителя Кумасси R-250, инкубируя гель в водном растворе, содержавшем 0,05% красителя, 25% изопропанола, 10% уксусной кислоты на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Фон отмывали дистиллированной водой на водяной бане в течение 1 ч.

ММ денатурированного белка определяли с помощью Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific), содержавшего β-галактозидазу (116 кДа), БСА (66,2 кДа), овальбумин (45,0 кДа), лактат дегидрогеназу (35,0 кДа), REase Vsp98I (25,0 кДа), β-лактоглобулин (18,4 кДа), лизоцим (14,4 кДа). ММ белков рассчитывали по калибровочной кривой, выражавшей зависимость между логарифмом молекулярной массы и относительной электрофоретической подвижностью (R_f) белков-стандартов.

Нативный электрофорез проводили в ПААГ с градиентом концентрации 5-12% в системе для кислых белков: 5-12% акриламид-метиленабисакриламид; 0,375 М Трис-HCl, pH 8,8; 0,025%

ТЕМЕД; 0,025% персульфат аммония. Режим электрофореза: 90 мА, стабилизация по току. В качестве белковых маркеров использовали набор High Molecular Weight Native Marker Kit (GE Healthcare), содержащий тироглобулин (669 кДа), ферритин (440 кДа), каталазу (232 кДа), лактатдегидрогеназу (140 кДа) и БСА (66 кДа). Белковые полосы проявляли по Fairbanks с использованием красителя Кумасси R-250, а также проявляли на активность, инкубируя гель в Na-ацетатном буфере с 2 мМ АБТС в течение 20 мин на водяной бане при 60°C.

Определение активности лакказ. Активность лакказ определяли спектрофотометрически по скорости окисления АБТС. Метод основан на определении продуктов окисления АБТС при 420 нм, молярный коэффициент светопоглощения (ϵ) при 420 нм составляет 36000 М⁻¹см⁻¹ (Heinfling *et al.*, 1998). Реакция проводилась при комнатной температуре. Скорость окисления АБТС регистрировали на спектрофотометре при 420 нм. Активность фермента выражали в единицах активности. За единицу активности принимали количество фермента, образующего 1 мкмоль продукта за 1 мин.

Определение pH-оптимумов, температурных оптимумов и термостабильности. Определение pH оптимумов окисления субстратов проводили спектрофотометрически в 50 мМ буфере Britton and Robinson для ферментов Ас-629 (диапазон pH 3,8-5,2 и 8,0-9,0 с шагом 0,2) и Ас-993 (диапазон pH 3,0-5,4 и 6,5-9,8 с шагом 0,3). Для белка Ас-1709 диапазон pH составил 3,0-5,0 (50 мМ Na-цитратный буфер) и 7,0-9,5 (50 мМ Трис-НСI-буфер) с шагом 0,5. В качестве субстратов использовали 1 мМ АБТС (при кислых значениях pH) и 1 мМ 2,6-ДМФ (при щелочных значениях pH).

Термостабильность лакказ определяли спектрофотометрически в 50 мМ буфере Britton and Robinson в случае лакказ из штаммов Ас-993 (pH буфера 4,0) и Ас-629 (pH буфера 4,4). Для определения термостабильности лакказы из штамма Ас-1709 использовали 50 мМ Na-ацетатный буфер (pH 4,0). В качестве субстрата использовали 1 мМ АБТС. Для оценки стабильности ферменты инкубировали при определенной температуре (60°C, 70°C, 80°C – для фермента Ас-1709; 80°C, 90°C, 100°C – для Ас-993, 90°C, 100°C – для Ас-629) в течение часа, измеряя остаточную активность каждые 10 мин.

Температурный оптимум определяли спектрофотометрически в диапазоне температур 35°C-75°C для лакказы Ас-1709 (50 мМ Na-цитратный буфер, pH 4,0), 35°C-85°C для лакказы Ас-993 (50 мМ буфер Britton and Robinson, pH 4,0), 35°C-90°C для лакказы Ас-625 (50 мМ буфер Britton and Robinson, pH 4,4). В качестве субстрата использовали 1 мМ АБТС.

Определение спектров поглощения. Спектры поглощения лакказ записывали на спектрофотометре Shimadzu UV-1650 PC при комнатной температуре. Объем кюветы – 1 мл, длина оптического пути – 1 см.

Определение субстратной специфичности. Активность лакказ в отношении некоторых органических и неорганических соединений определялась по изменению спектра поглощения реакционной смеси. Реакционная среда объемом 1 мл содержала 50 мМ буфер Britton and Robinson, pH 8,5, ферментный препарат (20 мкл), а также феруловую, ванильную, гентизиновую, сиреневую кислоты, 4-метоксифенол, L-тирозин, гидрохинон, катехол, пирогаллол, октацианолибдат калия или ферроцианид калия в концентрации 1 мМ.

Определение кинетических констант. Константы Михаэлиса (K_m) и максимальные скорости реакций (V_{max}) определяли с помощью уравнения Михаэлиса-Ментен, а также посредством его линеаризации методом Лайнуивера-Берка в двойных обратных координатах $1/V$ и $1/[S]$ (Плакунов, 2001), где V – скорость катализируемой реакции, выраженная в единицах удельной активности, и S – концентрация субстрата. В качестве субстратов использовали 0,02-5 мМ АБТС (λ_{max} 420 нм, $\epsilon_{420}=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 0,05-5 мМ 2,6-ДМФ (λ_{max} 469 нм, $\epsilon_{469}=49600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 0,05-5 мМ ферроцианид (λ_{max} 420 нм, $\epsilon_{420}=1010 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Реакции проводили при комнатной температуре в 50 мМ буфере Britton and Robinson при значениях pH, оптимальных для каждого из белков.

Определение влияния ингибиторов на активность лакказ. Влияние ингибиторов на активность лакказ определяли по изменению скорости окисления ферментом субстратов АБТС (1 мМ) и 2,6-диметоксифенола (1 мМ). В качестве ингибиторов использовали азид натрия, фторид натрия, ЭДТА и фенантролин в концентрациях 1, 10 и 100 мМ. Все измерения проводили в 50 мМ буфере Britton and Robinson. Изменение скорости окисления АБТС под действием ингибиторов наблюдали при кислых значениях pH, 2,6-диметоксифенола – при щелочных значениях pH (для измерений буфер доводили до оптимального значения pH для каждого из анализируемых ферментов).

Определение концентрации белков. Концентрация белка была определена с использованием реактива Брэдфорд (Sigma) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве стандарта использовали БСА. Также концентрацию белка определяли

спектрофотометрически, коэффициенты экстинкции для каждого из ферментов определяли при помощи программы Vector NTI.

Кристаллизация рекомбинантных лакказ. Кристаллизацию лакказ проводила сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции д.б.н. Тищенко С.В. (Институт Белка РАН) (Tishchenko *et al.*, 2015; Trubitsina *et al.*, 2015). Для кристаллизации белков был использован метод диффузии паров в его модификации «висящая капля». Для кристаллизации лакказы *S. viridochromogenes* Ac-629 использовали раствор белка в концентрации 10 мг/мл в 50 мМ буфере $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-NaOH}$ (pH 9,0) с 0,1 М NaCl. На силиконированную стеклянную пластинку наносили 3 мкл раствора белка и в каплю белкового раствора добавляли 2 мкл раствора осадителя и 0,5 мкл 1,3% натриевой соли полиакриловой кислоты 5100. Раствор осадителя содержал 0,1 М NaCl, 0,1 М Трис-HCl, pH 7,5 и 11% полиэтиленгликоль (ПЭГ) 4К (раствор № 2.41 в наборе MemGold (Molecular Dimensions, Англия)). Пластинкой с находящейся на ней каплей накрывали ячейку кристаллизационного планшета «Linbro», в которую предварительно вносили 0,5 мл раствора осадителя. Герметично закрытые плашки инкубировали при 12°C. Кристаллы появлялись на 3-4 сутки и достигали максимальной величины 0,03×0,05×0,6 мм за 1-2 недели.

Для кристаллизации лакказы *S. griseoflavus* Ac-993 использовали раствор белка в концентрации 7 мг/мл в 50 мМ буфере $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-NaOH}$ (pH 9,0) с 0,1 М NaCl. На силиконированную стеклянную пластинку наносили 4 мкл раствора белка и добавляли 1 мкл осадителя. Раствор осадителя содержал 0,3 М NaCl, 0,01 М Трис-HCl, pH 8,0, 27,5% ПЭГ 4К (раствор № 1.5 в наборе MemGold (Molecular Dimensions, Англия)). Пластинкой с находящейся на ней каплей накрывали ячейку кристаллизационного планшета «Linbro», в которую предварительно вносили 0,5 мл раствора осадителя. Плашки инкубировали при 12°C. Кристаллы появлялись на 4-5 сутки и достигали максимальной величины 0,05×0,1×0,7 мм за 2-3 недели.

Для кристаллизации лакказы *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 использовали раствор белка в концентрации 15 мг/мл в 50 мМ буфере $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-NaOH}$ (pH 9,0) с 0,1 М NaCl. На силиконированную стеклянную пластинку наносили 2 мкл раствора белка и добавляли 1 мкл осадителя. Раствор осадителя содержал 0,1 М NaCl, 0,1 М бицин pH 9,0, 20% ММРЕГ 550 (раствор № 46 в наборе Crystal Screen 2 (Hampton Research, США)). Пластинкой с находящейся на ней каплей накрывали ячейку кристаллизационного планшета «Linbro», в которую предварительно вносили 0,5 мл раствора осадителя (0,1 М NaCl, 0,1 М бицин pH 9,0, 30%

MEPEG 550). Плашки инкубировали при 24°C. Кристаллы появлялись на 2-3 сутки и достигали максимальной величины 0,07×0,07×0,07 мм за 1 неделю.

Перед съёмкой кристаллов в жидком азоте, кристаллы лакказы Ac-629 были перенесены в криораствор – 35% ПЭГ 4 К, 0,1 М Трис-НСl, рН 7,5; кристаллы лакказы Ac-993 были перенесены в криораствор – 30% ПЭГ 4К, 0,1 М Трис-НСl, рН 8,0; кристаллы лакказы Ac-1709 были перенесены в криораствор – 0,1 М NaCl, 0,1 М бидин, рН 9.0, 37% ММЕPEG 550.

Сбор данных с кристаллов был произведен на синхротроне BESSY II, линия BL14.1 (Берлин, Германия). Кристаллы лакказы *S. viridochromogenes* Ac-629 отражали рентгеновские лучи с пределом разрешения 2,4 Å, кристаллы лакказы *S. griseoflavus* Ac-993 – с пределом разрешения 2,0 Å. Кристаллы лакказы *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, после вымачивания в криорастворе, содержащем 10мМ NaN₃ в течение 20 минут, отражали с пределом разрешения 2,4 Å.

Координаты и структурные факторы лакказ были помещены в базу данных Protein Data Bank: PDB ID: 4N8U (Ac-629); PDB ID: 4GYB, 4NAJ, 4NB7 (Ac-1709) и PDB ID: 5LHL (Ac-993). Пространственные структуры белков были определены методом молекулярного замещения в программе Phaser сотрудником лаборатории структурных исследований аппарата трансляции к.ф.-м.н. Габдулхаковым А.Г. (Институт Белка РАН) (Tishchenko *et al.*, 2015; Trubitsina *et al.*, 2015). В качестве стартовой модели использовалась модель структуры лакказы *S. coelicolor* (PDB ID: 3CG8). Трёхмерные структуры лакказ визуализированы в программе PyMOL.

Обесцвечивание красителей. Обесцвечивание красителей бриллиантового зелёного, малахитового зелёного и фуксина (50 мкМ в 50 мМ Na-ацетатном буфере, рН 5,0) проводили в присутствии медиатора АБТС (50 мкМ). Белки вносили в концентрации 10 мкг. Реакцию осуществляли в течение суток при комнатной температуре, об обесцвечивании судили по изменению спектра поглощения реакционной среды.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Выбор объектов исследования

Объектами исследования были бактерии рода *Streptomyces* так как большинство ранее охарактеризованных 2д лакказ были выделены из представителей этого рода: фермент SLAC – из *S. coelicolor*, EроА – из *S. griseus*, SilA – из *S. ipomoea* и Ss11 – из *S. sviceps*, MCO – из *S. griseorubens*, LMCO – из *S. pristinaespiralis*. Кроме того, большое количество «прочитанных» геномов стрептомицетов в базах данных с открытым доступом позволили провести анализ геномов на наличие генов 2д лакказ. Всего было проверено 16 геномов стрептомицетов. 2д Лакказы были обнаружены в геномах 10 бактерий. Бактерии, перечисленные в таблице 15, идентифицированы как носители генов 2д лакказ. Также в таблице 15 представлены штаммы, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов для дальнейшей работы.

Таблица 15.

Штаммы бактерий рода *Streptomyces* – носители генов 2д лакказ.

Штаммы из NCBI	Штаммы – объекты исследования
<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	<i>S. griseoflavus</i> Ac-993
<i>S. flavogriseus</i> ATCC33331	<i>S. hygroscopicus</i> Ac-831
<i>S. griseoflavus</i> Tu4000	<i>Streptomyces</i> sp. (<i>lividans</i>) Ac-1709
<i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653	<i>Streptomyces</i> sp. (<i>lividans</i>) Ac-235
<i>S. lividans</i> TK24	<i>S. viridochromogenes</i> Ac-629
<i>S. pristinaespiralis</i> ATCC 25486	
<i>S. scabiei</i> 87.22	
<i>S. sviceps</i> ATCC 29083	
<i>S. violaceusniger</i> Tu 4113	
<i>S. viridochromogenes</i> DSM 40736	

Отнесение целевого гена к 2д лакказам проводилось на основе анализа белковой последовательности на наличие консервативных медь-связывающих аминокислот: -НХН-НХН-НХХНХН-НСНХХХН- (рис. 16), а также основывалось на отсутствии одного из трёх доменов в структуре белка (рис. 17).

```

WP_037642830.1 ---MDRRGFNRRVLLGGAAVATTSLS---TASEAAGA-----TATARTAPAGGEVRRIKM
WP_007386096.1 MGALDRRGFNRRVLLGGAAVATS-LS---LAPEARSDAGF-----AQAAPGGEVRRIKL
NP_630785.1 ---MDRRGFNRRVLLGGAAAATS-LS---IAPEVAGAAPAAKGITARTAPAGGEVRRHLKM
ABH10611.1 ---MDRRGFNRRVLLGGAAVATS-LS---IAPETAGAAGDAKGV TARTAPAGGEVRRHLKM
WP_037773190.1 ---MDRRSFNRRLLAGGAAAAATGVTSLSITSA-SNAAPAPAKGAPRTAQAGGQVRHLKM
WP_030846765.1 ---MDRRAFSRRMLVGGAAAAATGVTSLSLGAV-EA---SSAEKPPRTAPAGGVVRRLLKM
:***.*.***:* ****.*:: : : * ** **::*

WP_037642830.1 YAERLDGGQMGYGFEEKKATIPGPLIELNEGDTLHIEFENTMDVPVSLHVVHGLDYEISSD
WP_007386096.1 YAERLADGQMGYGLEKGRATIPGPLIELNEGDTLHIEFENTMDVRASLHVVHGLDYEIVSSD
NP_630785.1 YAEKLADGQMGYGFEEKKASVPGPLIEVNEGDTLHIEFTNTMDVRASLHVVHGLDYEISSD
ABH10611.1 YAEKLPDGQMGYGLEKGRATIPGPLIELNEGDTLHIEFTNTMDVRASLHVVHGLDYEISSD
WP_037773190.1 YAEKLRADGSMGYGLEKGRATVPGPLIELVEGDTLHIEFENLMDVPVSLHVVHGLDYEIVSSD
WP_030846765.1 YAEKLPDGLGQMGYGFEEKKASIPGPLIELNEGDTVHIDFENLTDVVDASLHVVHGLDYEIVSSD
***: *.:***:***:*.::*****: ****.*:* * ** .*** **:*:***:*.

WP_037642830.1 GTQQNKSAVEPGGTRTYTWRTHRPGRRDGTWRAGSAGYWHYHDHVVGTEHGTGGIRNGL
WP_007386096.1 GTTLNKSDVEPGGTRTYTWRTHAPGRRSDGTWRAGSAGYWHYHDHVVGTEHGTGGIRKGL
NP_630785.1 GTAMNKSDVEPGGTRTYTWRTHKPGRRDDGTWRPGSAGYWHYHDHVVGTEHGTGGIRNGL
ABH10611.1 GTAMNKSDVEPGGTRTYTWRTHKPGRRADGTWRAGSAGYWHYHDHVVGTEHGTGGIRKGL
WP_037773190.1 GTKMSRSHVEPGATRTY TWRTHAPGRRADGTWRPGSAGYWHYHDHVVGTDHGTGGIRKGL
WP_030846765.1 GTRMNSHVEPGGTRTYTWRTHAPGRRKDGTEWEPGSAGYWHYHDHVVGTDHGTGGIRKGL
** .:* ****.****** **** * ** .*****:***

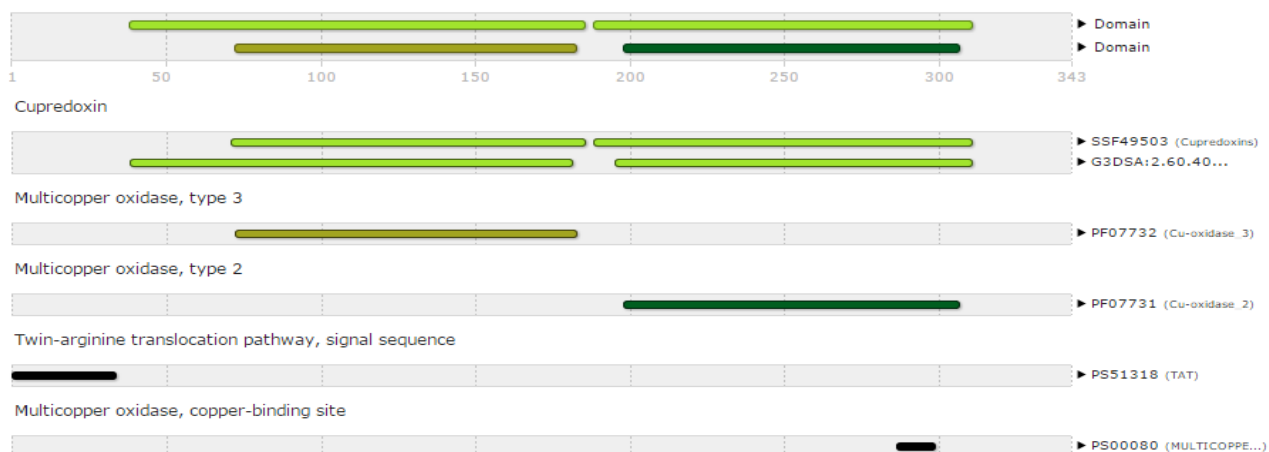
WP_037642830.1 YGPVIVRRKGDVLPDATHTIVFNDMTINNKAHTGPDFEATVGDRVEIVMITHGEYYHTF
WP_007386096.1 YGPVIVRRKGDVLPDATHTIVFNDMLINNRPAHSGPNFEATVGDRVEIVMITHGEYYHTF
NP_630785.1 YGPVIVRRKGDVLPDATHTIVFNDMTINNRPHTGPDFEATVGDRVEIVMITHGEYYHTF
ABH10611.1 YGPVIVRRKGDVLPDATHTIVFNDMLINNRAPHTGPNFEATVGDRVEIVMITHGEYYHTF
WP_037773190.1 YGPMVVRKDDILPDKQFTIVFNDMTINNRAADPPNPLATVGDRVEIVMITHGEYYHTF
WP_030846765.1 YGPVVVRRKGDILPDQCTVVFNDMMINNKTAHNSVNFEATVGDRLEFVIMITHGEYYHTF
***:**** *:* ** *:* ** * ** : * *****:*.:*****

WP_037642830.1 HMHGHRWADNRTGILTPDDPTRVVDTKICGPADSFQVVIAGEGAGAWMYHCHVQSH
WP_007386096.1 HMHGHRWADNRTGMLTPDDPSQVVDNKIVGPADSFQVVIAGEGAGAWMYHCHVQSH
NP_630785.1 HMHGHRWADNRTGILTPDDPSRVIDNKITGPADSFQVVIAGEGAGAWMYHCHVQSH
ABH10611.1 HMHGHRWADNRTGMLTPDDPSQVIDNKITGPADSFQVVIAGEGAGAWMYHCHVQSH
WP_037773190.1 HMHGHRWADNRTGLLSPEDVSRVIDNKITGPADSFQVVIAGEHVGPGAWMYHCHVQSH
WP_030846765.1 HIHGHRWADNRTGLLTPDDPSRVIDNKICGPADSFGLQVIAGERVAGAWMYHCHVQSH
*:* *****:*.:* * :*:*. ** *****:*.:* ** *****

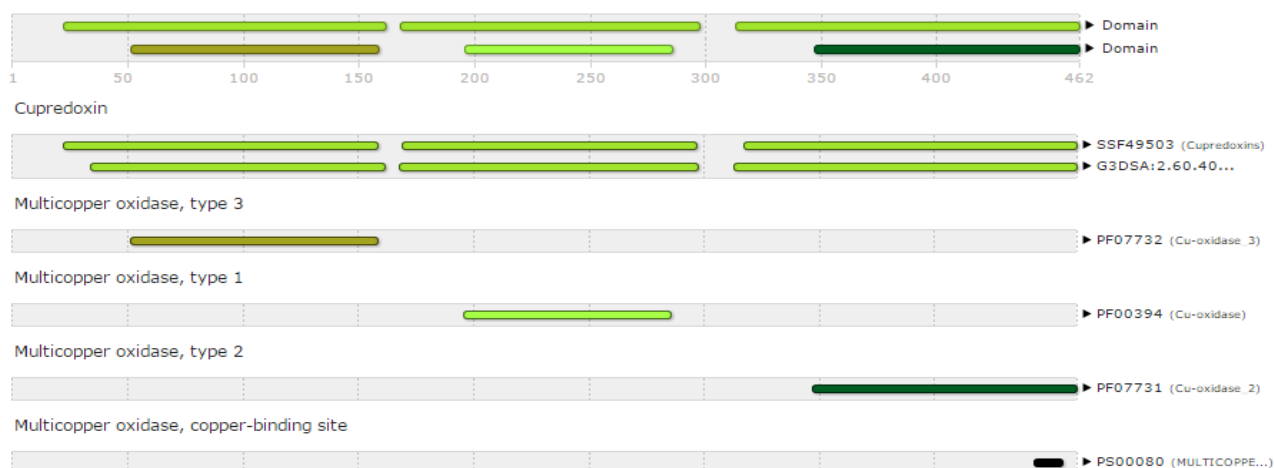
WP_037642830.1 SDMGVGLFLVRKPDGTIPGHDPHEHAHTAASGEK---PGHAH-----
WP_007386096.1 SDMGVGLFLVKKTDGTIPGYEPHEHSGQRAENHH-----
NP_630785.1 SDMGVGLFLVKKPDGTIPGYEPHEHGATAKSGE---SGEPTGGAAAHENEH
ABH10611.1 SDMGVGLFLVKKPDGTIPGYDPHEHAHG-----GGEPTADAPAHQH--
WP_037773190.1 SDMGVGLFLVAKEDGTIPGYEPHPTSEEGHDH-----
WP_030846765.1 SDMGVGLLLIKKPDGTIPGYEPHHTAGAEKRTENGAGEKAAGAGGHQH--
****.*:*:* * *****:***.

```

Рисунок 16. Выравнивание аминокислотных последовательностей охарактеризованных 2д лакказ. Обозначения: *S. coelicolor* A3(2) (NP_630785.1), *S. griseus* (WP_030846765.1), *S. ipomoeae* (ABH10611.1), *S. svicens* (WP_007386096.1), *S. griseorubens* (WP_037642830.1), *S. pristinaespiralis* ATCC 25486 (WP_037773190.1). Подчёркиванием выделены консервативные аминокислоты, участвующие в связывании четырёх атомов меди. Гомологичные аминокислотные остатки выделены точками, идентичные – звёздочками.



A



Б

Рисунок 17. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности 2д лакказы *S. coelicolor* A3(2) (NP_630785.1) (А) и аминокислотной последовательности термостабильной 3д лакказы *Thermus thermophilus* HB27 (WP_011173754.1) (Б) с помощью программы InterPro.

3.2. Клонирование генов двухдоменных лакказ

Для клонирования генов 2д лакказ были разработаны специфичные праймеры (табл. 16). Праймеры были написаны к началу и концу генов лакказ, обнаруженных в базе данных NCBI, и позволяли клонировать полную последовательность гена лакказы, включая последовательность сигнального пептида.

Таблица 16.

Олигодезоксирибонуклеотиды для клонирования генов 2д лакказ.

Штамм	Название	Нуклеотидная последовательность (направление 5' – 3')
<i>Streptomyces</i> sp. (<i>lividans</i>) Ac-235, Ac-1709	S.livF S.livR	ATGGACAGGCGAGGCTTCAA TCAGTGCTCGTGTTTCGTGTG
<i>S. viridochromogenes</i> Ac-629	S.virF S.virR	ATGGACAGACGCAGCTTCAA CGTCAGTGCTCGTGGCC
<i>S. hygroscopicus</i> Ac-831	S.hrF S.hrR	ATGCCCAGACGCGGCTTACG GCGCACGAGCTATGACCC
<i>S. griseoflavus</i> Ac-993	S.gfF S.gfR	ATGGACAGACGCGGTTTCAA TCAGTGCGCGTGCTCCTGGC

Стрептомицеты относятся к грамположительным бактериям, обладающим прочной клеточной оболочкой. Использование для выделения ДНК коммерческого набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) не всегда давало удовлетворительный результат. Только из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629, *S. hygroscopicus* Ac-831 и *S. griseoflavus* Ac-993 геномная ДНК была выделена с использованием этого набора. Однако такой подход был неэффективен для других штаммов. Для получения ДНК из штаммов *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-235 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 использовали методику выделения с ионным детергентом – бромистым цетилтриметиламмонием (ЦТАБ). Данная методика обычно используется для выделения ДНК из растительных источников. В дополнение, для большего выхода ДНК при её выделении с коммерческим набором проводилось предварительное механическое разрушение биомассы растиранием в жидком азоте. Выделенная указанными способами ДНК использовалась для проведения ПЦР (рис. 18).

С использованием праймеров (табл. 16) у штаммов *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-235, *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 были получены ПЦР-продукты ожидаемой величины (1032 п.о. для штаммов Ac-235 и Ac-1709, 978 п.о. для штамма Ac-629 и 987 п.о. для штамма Ac-993). У штамма *S. hygroscopicus* Ac-831 продукта необходимой величины (1035 п.о.) получено не было (рис. 19).

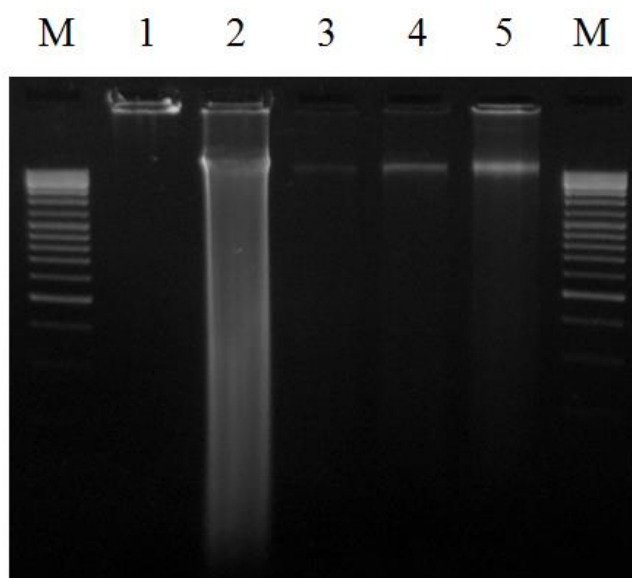


Рисунок 18. Геномная ДНК из штаммов бактерий рода *Streptomyces*. Обозначения: *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-235 (1), *S. viridochromogenes* Ac-629 (2), *S. hygrosopicus* Ac-831 (3), *S. griseoflavus* Ac-993 (4), *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 (5). М – маркеры ДНК HyperLadder I.

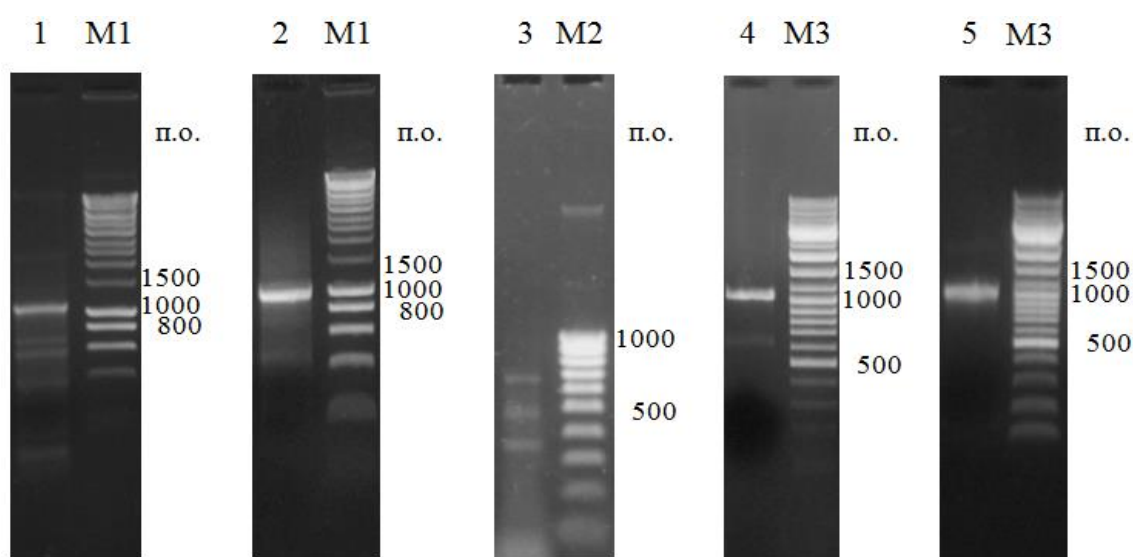


Рисунок 19. Продукты ПЦР-амплификации, полученные с использованием специфичных праймеров. М1 – маркеры ДНК HyperLadder I, М2 – маркеры ДНК MassRuler Low Range DNA Ladder, М3 – маркеры ДНК MassRuler DNA Ladder Mix, 1 – продукты ПЦР-амплификации ДНК штамма *S. griseoflavus* Ac-993, 2 – *S. viridochromogenes* Ac-629, 3 – *S. hygrosopicus* Ac-831, 4 – *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-235, 5 – *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709.

Полученные с помощью ПЦР ДНК-фрагменты были очищены и клонированы. Определены их нуклеотидные последовательности. Установлено, что аминокислотная последовательность 2д лакказы из штамма *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 имела 100% гомологию с последовательностью медьсодержащей оксидазы из штамма *S. lividans* TK24 (EFD65350.1). Аминокислотная последовательность 2д лакказы из штамма *S. viridochromogenes* Ac-629 имела степень гомологии 85% с последовательностью медьсодержащей оксидазы из штамма *S. viridochromogenes* DSM 40736 (WP_003994334.1). Аминокислотная последовательность 2д лакказы из штамма *S. griseoflavus* Ac-993 имела степень гомологии 90% с последовательностью медьсодержащей оксидазы из штамма *S. griseoflavus* Tu4000 (WP_004922484.1). На рисунке 20 представлены результаты выравнивания полученных аминокислотных последовательностей с последовательностями медьсодержащих оксидаз, доступных в NCBI. Выравнивания последовательностей проводились в программе Clustal Omega.

```

Ac-629      MDRRSFNRRVLLGGATVATSLSLTSVPEVAGAAAPARTAPAGGEVRHLKLYIEKLADGQL
DSM40736    MDRRSFNRRVLLGGAAVATSLSV--APEAISADGPAKTAPAGGEVKRIKLYAEKLPDGM
*****:*****:  .** .* .**.******:.:*** ** ** *:

Ac-629      GYGFEKGRATIPGPLIELNEGDTAHIEVENTLDVPASLHVHGLDYEITSDGTKLNRSDVE
DSM40736    GYGLEK GKASIPGPLIELNEGDTLHVEFENTMDVAVSLHVHGLDYEITSDGTKLNRSHVE
***:***:*.:***** *:* .***:* * .*****:*****: **

Ac-629      PGGTRTYTWRTHAPGRRADGTWRAGSAGYWHYHDHVVGTEHGTGGIRKGLYGPVVRRKG
DSM40736    PGGTRTYTWRTHAPGRRKDGTWRAGSAGYWHYHDHVVGTEHGTQGLQKGLYGPVIVRRKG
***** * *****:***** *.:*****:*****

Ac-629      DVLPDATHTIVFNDMLINNQPAHSGPNFEATVGDRVEFVMI THGEYYHTFHMHGHRWADN
DSM40736    DVLPDRTHTVFNDMRINNRPPHSGPDFEATVGDRVEFVVI THGEFYHTFHMHGHRWADN
***** ***:***** ***: * *****:*****:*****:*****

Ac-629      RTGLLTGPDDPSQVIDNKIVGPADSFQVIAGEGVGAGAWMYHCHVQSHSDMGMVGLFL
DSM40736    RTGMLTGPDDPSQVIDNKITGPADSFQVIAGEGVGAGAWMYHCHVQSHSDMGMVGLFL
***:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Ac-629      VKKKDGTIPGHEH-----
DSM40736    VKKPDGTIPGYDPHEHGEQPPAGGHEH
*** *****:

```

A

```

Ac-993      MDRRGFNRRVLLGGVAATTSLSIAPEAVSAPESAGTAAAAGAAPAGGEVRRVTMYAERLA
Tu4000      MDRRGFNRRVLLGGAAVATSLSLIAPEAVSAAARP-----AKTAPAGGEVRRVKMYAERLD
*****.*.:***** * . * :*****.*****

Ac-993      GGQMGYGLEK GKASIPGPLIELNEGDTLHVEFENTMDVPVSLHVHGLDYEISSDGTKQNK
Tu4000      GGRMGYGFEGKASVPGPLIELNEGDTLHIELENTMDVPASLHVHGLDYEISSDGTKQNN
**:* ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Ac-993      SHVEPGGTRTYTWRTHPEPGRADGTWRAGSAGYWHYHDHVVGTEHGTGGIRNGLYGPVIV
Tu4000      SHVEPGATRTYTWRTHKPGRRSDGTWRAGSAGYWHYHDHVVGTVHGTGGIRNGLYGPVVV
*****.*****:*****:*****:***** *****:*****: *

Ac-993      RRKGDVLPDATHTIVFNDMTINNRP AHTGPNFEATVGDRVEIVMI THGEYYHTFHMHGHR
Tu4000      RRKDDVLPDATHTIVFNDMSINNRP AHTGPDFEATVGDRVEIVMI THGEYYHTFHMHGHR
***.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Ac-993 WADNRTGMLTGPDDPSQVIDNKICGPADSFQI IAGEGVGAGAWMYHCHVQSHSDMG MV
 Tu4000 WADNRTGMLTGPDDPSQVIDNKICGPADSFQI IAGEGVGAGAWMYHCHVQSHSDMG MV

Ac-993 GLFLVKKPDGTIPGYDPQEHAH-----
 Tu4000 GLFLVKKPDGTIPGYDPHEHAHGA AAKEGQEHAH
 ***** : *****

Б

Ac-1709 MDRRGFNRRVLLGGAAAATSL SIAPEVAGAAPAAKGITARTAPAGGEVRHLKMYAEKLAD
 TK24 MDRRGFNRRVLLGGAAAATSL SIAPEVAGAAPAAKGITARTAPAGGEVRHLKMYAEKLAD

Ac-1709 GQMGYGFEEKKASVPGPLIEVNEGDTLHIEFTNTMDVRASLHVHGLDYEISSDGTAMNKS
 TK24 GQMGYGFEEKKASVPGPLIEVNEGDTLHIEFTNTMDVRASLHVHGLDYEISSDGTAMNKS

Ac-1709 DVEPGGTRTYTWRTHKPGRRDDGTWRPGSAGYWHYHDHVVGTEHGTGGIRNGLYGPVIVR
 TK24 DVEPGGTRTYTWRTHKPGRRDDGTWRPGSAGYWHYHDHVVGTEHGTGGIRNGLYGPVIVR

Ac-1709 RKGDVLPDATHTIVFNDMTINNRKPHTGPDFEATVGDRVEIVMITHGEY YHTFHMHGHRW
 TK24 RKGDVLPDATHTIVFNDMTINNRKPHTGPDFEATVGDRVEIVMITHGEY YHTFHMHGHRW

Ac-1709 ADNRTGILTGPDDPSRVIDNKITGPADSFQI IAGEGVGAGAWMYHCHVQSHSDMG MVG
 TK24 ADNRTGILTGPDDPSRVIDNKITGPADSFQI IAGEGVGAGAWMYHCHVQSHSDMG MVG

Ac-1709 LFLVKKPDGTIPGYEPHEHG GATAKSGESGPTGGAAAHENEN
 TK24 LFLVKKPDGTIPGYEPHEHG GATAKSGESGPTGGAAAHENEN

В

Рисунок 20. Результаты выравнивания полученных аминокислотных последовательностей 2д лакказ. Представлены последовательности лакказ из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629 (А), *S. griseoflavus* Ac-993 (Б) и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 (В), с последовательностями медьсодержащих оксидаз из штаммов *S. viridochromogenes* DSM 40736, *S. griseoflavus* Tu4000 и *S. lividans* ТК24, соответственно. Гомологичные аминокислотные остатки выделены точками, идентичные – звёздочками.

3.3. Экспрессия генов, очистка рекомбинантных белков

Далее была проведена ПЦР-амплификация генов лакказ с использованием праймеров для клонирования в экспрессионный вектор (табл. 17). Прямые праймеры на 5'-конце несли сайт эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, обратные праймеры – сайт *Hind*III (сайты рестрикции в таблице 17 выделены курсивом и подчёркиванием).

Таблица 17.

Олигодезоксирибонуклеотиды для экспрессии генов 2д лакказ.

Штамм	Название	Нуклеотидная последовательность (направление 5' – 3')
<i>Streptomyces</i> sp. (<i>lividans</i>) Ac-1709	S.livFe S.livRe	AGTGGATCCATGGACAGGCGAGGCTTCAA TCAAAGCTTTCAGTGCTCGTGTTTCGTGTG
<i>S. viridochromogenes</i> Ac-629	S.virFe S.virRe	AGTGGATCCATGGACAGACGCAGCTTCAA TCAAAGCTTTCAGTGCTCGTGGCC
<i>S. griseoflavus</i> Ac-993	S.gfFe S.gfRe	AGTGGATCCATGGACAGACGCGGTTTCAA TCAAAGCTTTCAGTGCGCGTGCTCCTGGC

Продукты ПЦР и плазида, используемая для экспрессии, были обработаны эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII. Затем проводилось лигирование продуктов ПЦР и плазмиды, в результате чего ген располагался под T5-промотором. В результате рекомбинантный белок содержал на N-конце шесть остатков гистидина. Далее проводилась оценка экспрессия генов в штамме *E. coli* M15(pRep4). Общая схема получения трансформантов, способных к продукции рекомбинантных белков, представлена на рисунке 21. Общая схема наработки и очистки рекомбинантных белков представлена на рисунке 22.

Было установлено, что рекомбинантные ферменты из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 были склонны к агрегированию. Для лакказы из штамма *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 агрегирования в процессе экспрессии не наблюдалось. Для устранения эффекта агрегирования индукция ферментов из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 проводилась внесением 0,1 мМ ИПТГ (для индукции лакказы из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 использовалась концентрация индуктора 1 мМ). Температура в процессе индукции была снижена до 18°C и время увеличено до 17-18 ч. Для фермента из штамма Ac-1709 время индукции составило 4 ч при температуре 37°C (рис. 22).

Разработка праймеров для клонирования генов в экспрессионный вектор

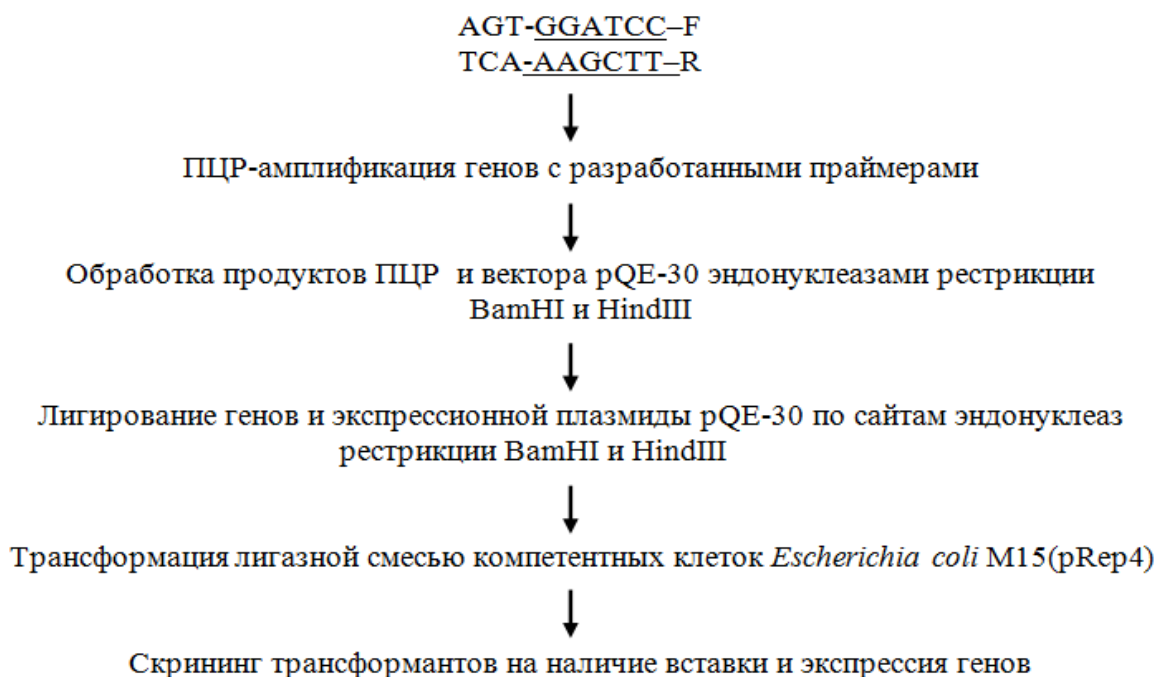


Рисунок 21. Схема получения эффективных продуцентов рекомбинантных белков.

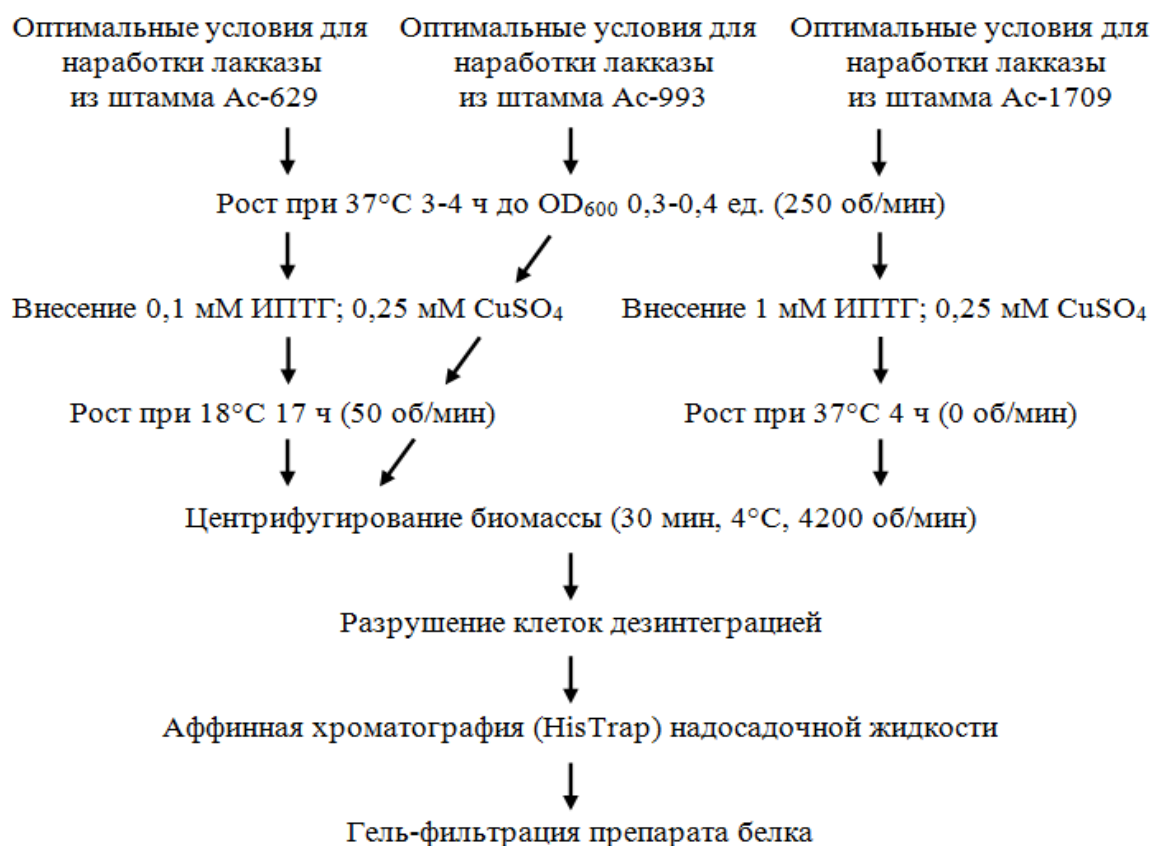


Рисунок 22. Схема получения рекомбинантных белков.

Для очистки белков использовали металл-аффинную хроматографию. Наличие шести остатков гистидина на N-конце рекомбинантных белков, способных специфически связываться с Ni-сефарозой, позволило проводить очистку в одну стадию. Удаление неспецифически связавшихся с носителем белков проводили буфером 2 с концентрацией имидазола 10 мМ. Элюцию целевых белков проводили буфером 3 с концентрацией имидазола 0,5 М. Для перевода очищенных белков в другой буфер проводили гель-фильтрацию на колонке 26/60 HiLoad Superdex 200 (рис. 23, 24, 25).

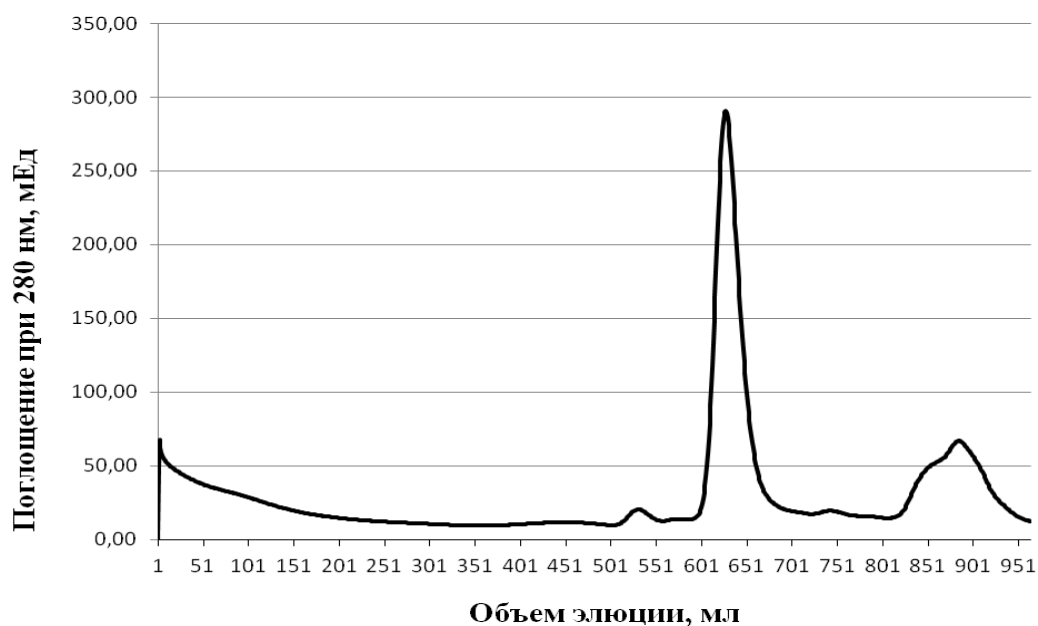


Рисунок 23. Профиль элюции рекомбинантной лакказы *S. viridochromogenes* Ac-629 при гель-фильтрации на колонке 26/60 HiLoad Superdex 200. — — поглощение при 280 нм.

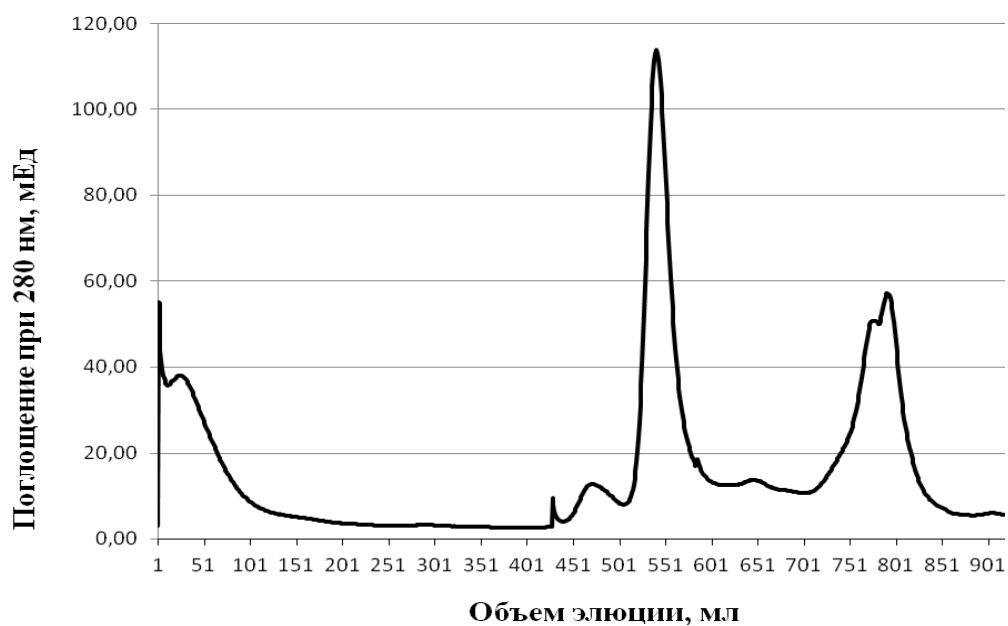


Рисунок 24. Профиль элюции рекомбинантной лакказы *S. griseoflavus* Ac-993 при гель-фильтрации на колонке 26/60 HiLoad Superdex 200. — — поглощение при 280 нм.

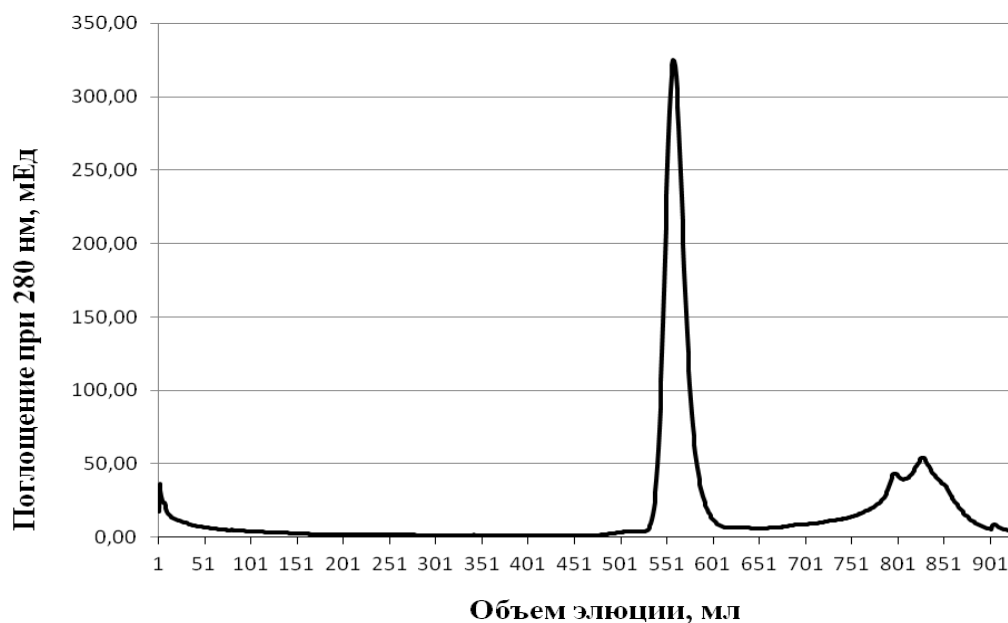


Рисунок 25. Профиль элюции рекомбинантной лакказы *Streptomyces* sp. (*lividans*) при гель-фильтрации на колонке 26/60 HiLoad Superdex 200. — — поглощение при 280 нм.

3.4. Характеристика рекомбинантных белков

3.4.1. Молекулярные свойства белков

По данным ПААГ с ДДС-Na ММ рекомбинантных белков из штаммов *S. viridochromogenes* Ас-629, *S. griseoflavus* Ас-993 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ас-1709 были равны 41,5 кДа, 37,3 кДа и 40,5 кДа, соответственно, в денатурирующих условиях (рис. 26). Теоретически рассчитанная на основании аминокислотной последовательности ММ рекомбинантных белков была равной 35,3 кДа, 36,1 кДа и 38,3 кДа для ферментов из штаммов Ас-629, Ас-993 и Ас-1709, соответственно.

ММ очищенных ферментов, определенные с помощью нативного электрофореза, составляли 110 кДа, 106 кДа и 120 кДа для препаратов из штаммов Ас-629, Ас-993 и Ас-1709, соответственно (рис. 27).

Полученные данные указывают на то, что все три рекомбинантных белка представляли собой гомотримеры. Все ферменты обладали активностью только в форме гомотримера (рис. 27).

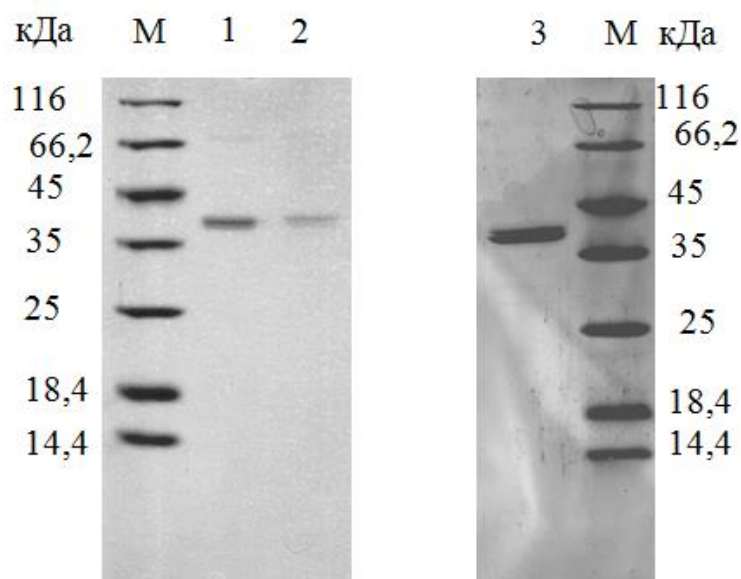


Рисунок 26. Электрофореграммы очищенных рекомбинантных лакказ из трёх бактерий рода *Streptomyces* (ПААГ с ДДС-Na). 1. Лакказа *S.viridochromogenes* Ас-629. 2. Лакказа *S.griseoflavus* Ас-993. 3. Лакказа *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ас-1709. М – белки-маркеры Unstained Protein Molecular Weight Marker (п. 2.2.4.).

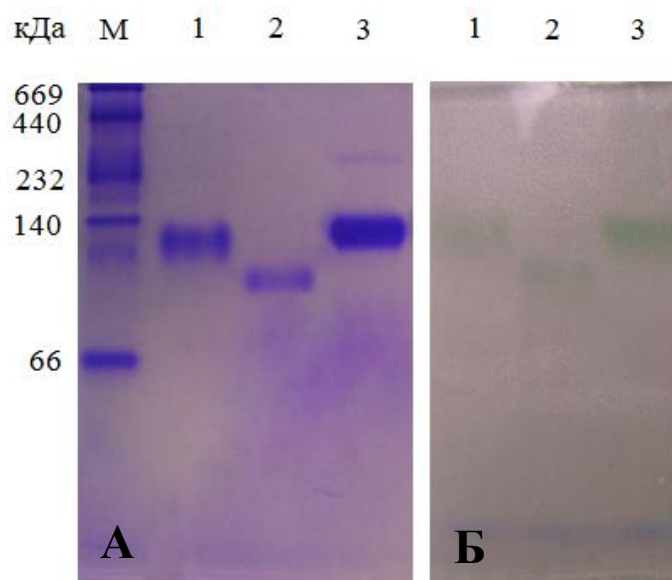


Рисунок 27. Электрофореграммы очищенных рекомбинантных ферментов. Нативный электрофорез с градиентом концентрации полиакриламида 4-10%. А. Окрашивание белков КумассиR-250. Б. Специфическое окрашивание на лакказную активность (2 мМ АБТС). 1. Лакказа *S. viridochromogenes* Ac-629, 2. Лакказа *S. griseoflavus* Ac-993, 3. Лакказа *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709. М – белки-маркеры High Molecular Weight Native Marker Kit (п. 2.2.4.).

3.4.2. Физико-химические свойства ферментов

Для определения рН-оптимумов работы ферментов использовались два тестовых субстрата лакказ – АБТС и 2,6-ДМФ. Рекомбинантные лакказы *S. viridochromogenes* Ac-629, *S. griseoflavus* Ac-993 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 окисляли АБТС при оптимальных значениях рН, равных 4,5, 4,2 и 4,0, соответственно. Оптимумы рН при окислении 2,6-ДМФ находились в щелочной области и составляли 8,4, 9,2 и 8,5 для ферментов Ac-629, Ac-993 и Ac-1709, соответственно (рис. 28 А, Б, В).

Стабильность препаратов ферментов при различных значениях рН определялась при инкубирования при комнатной температуре в течение семи суток. Лакказы из штаммов Ac-629 и Ac-1709 были более стабильны при щелочных значениях рН. Ферменты при рН 11,0 сохраняли более 80% начальной активности (рис. 29 А, В). Лакказа из штамма Ac-993 была более стабильна при значениях рН 7,0 и 9,0. Остаточная активность фермента при данных значениях составляла 73% и 71%, соответственно (рис. 29 Б).

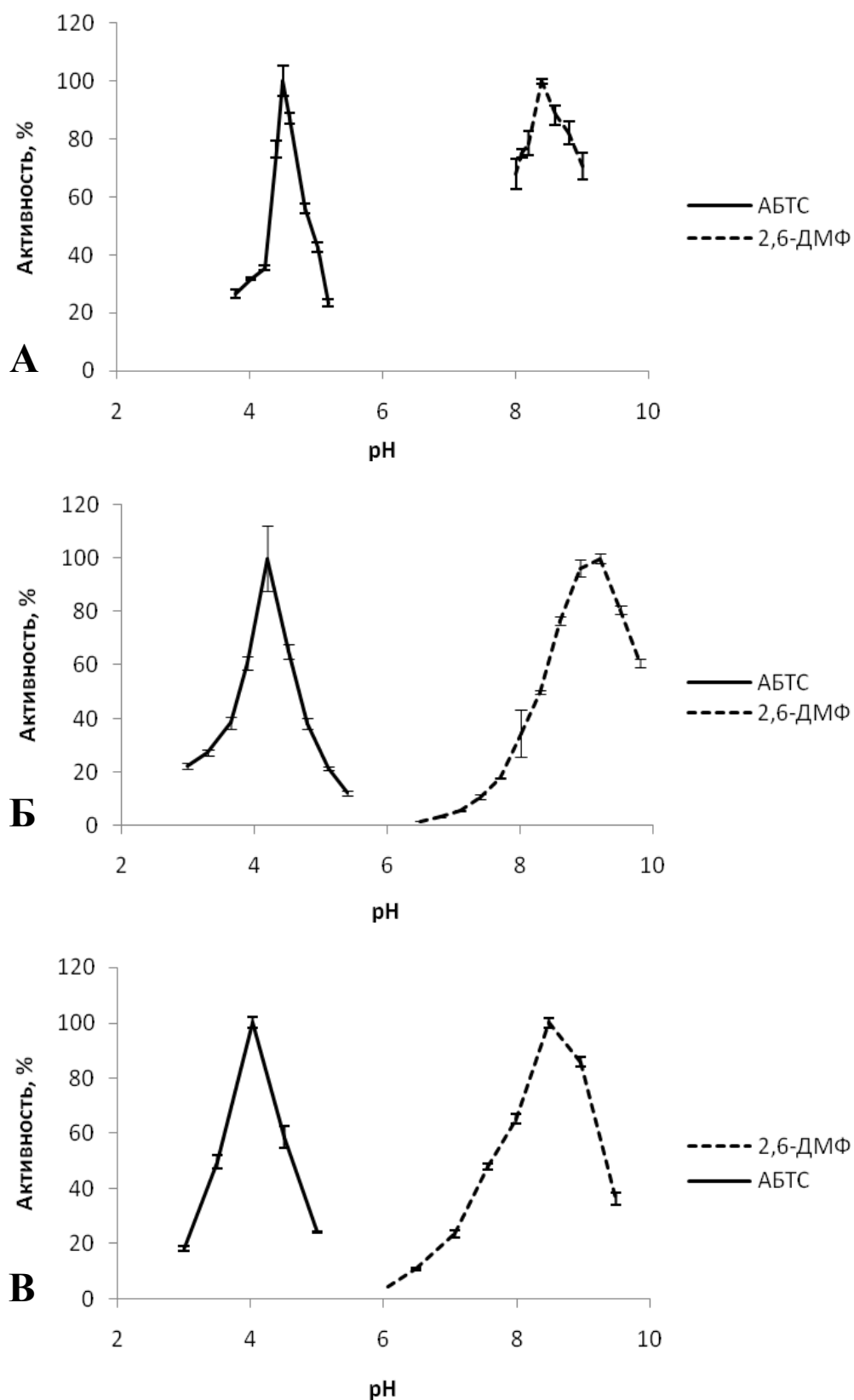


Рисунок 28. Оптимумы pH рекомбинантных лакказ *S. viridochromogenes* Ac-629 (А), *S. griseoflavus* Ac-993 (Б) и *Streptomyces sp. (lividans)* Ac-1709 (В).

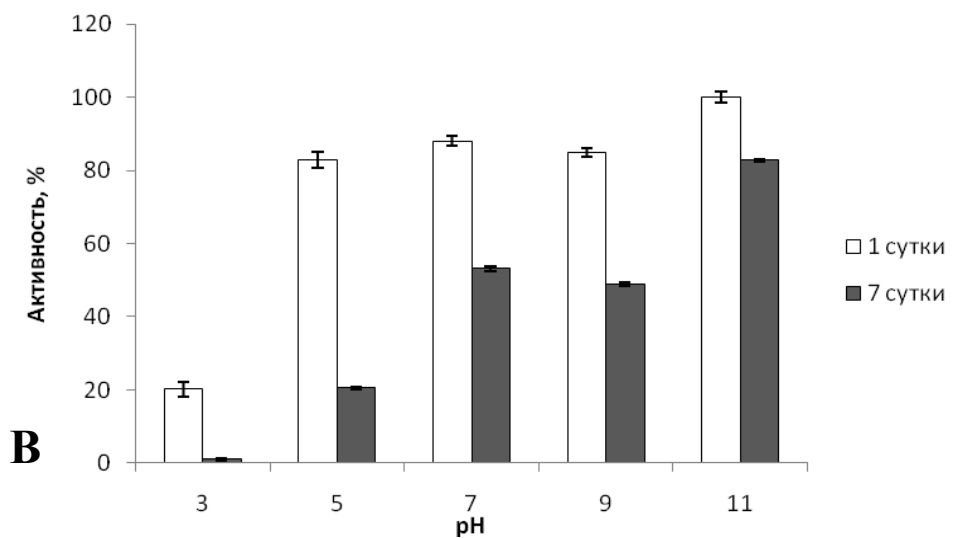
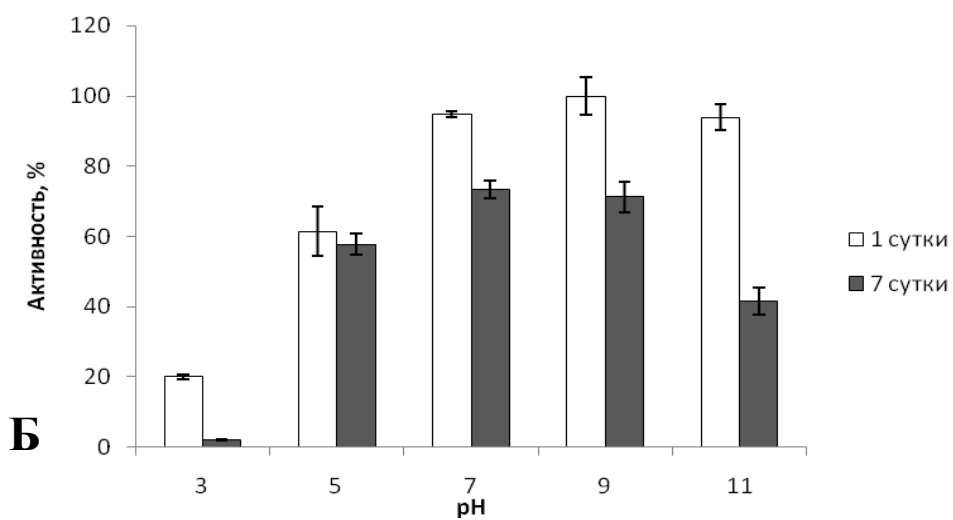
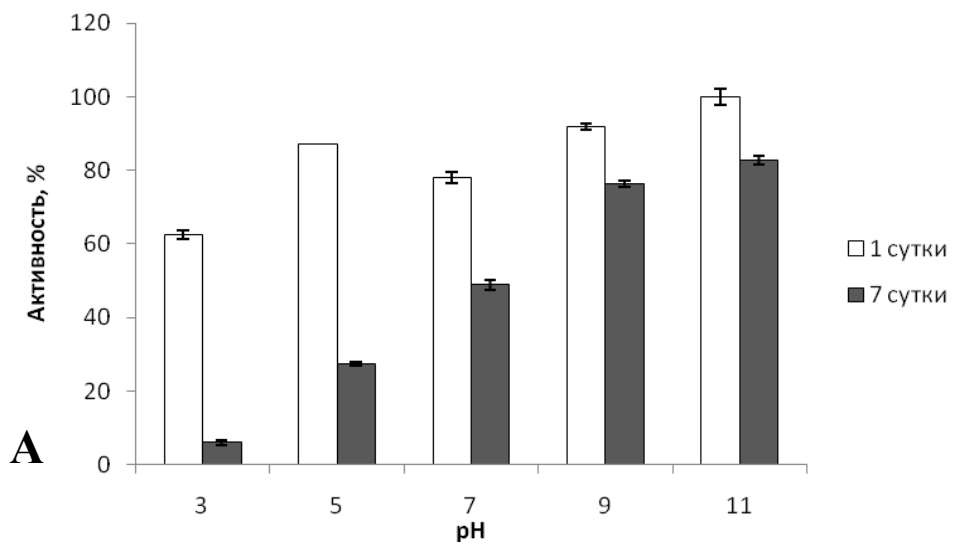


Рисунок 29. Стабильность рекомбинантных лакказ *S. viridochromogenes* Ac-629 (А), *S. griseoflavus* Ac-993 (Б) и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 (В) при различных значениях pH.

Изучение влияния температуры на активность рекомбинантных лакказ показало, что лакказа *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 демонстрировала максимальную скорость окисления АБТС при 65°C, *S. griseoflavus* Ac-993 – при 75°C. Для фермента *S. viridochromogenes* Ac-629 не удалось определить температуру, при которой фермент был бы максимально активен в отношении АБТС. В диапазоне температуры 35-90°C наблюдалось возрастание активности фермента (рис. 30).

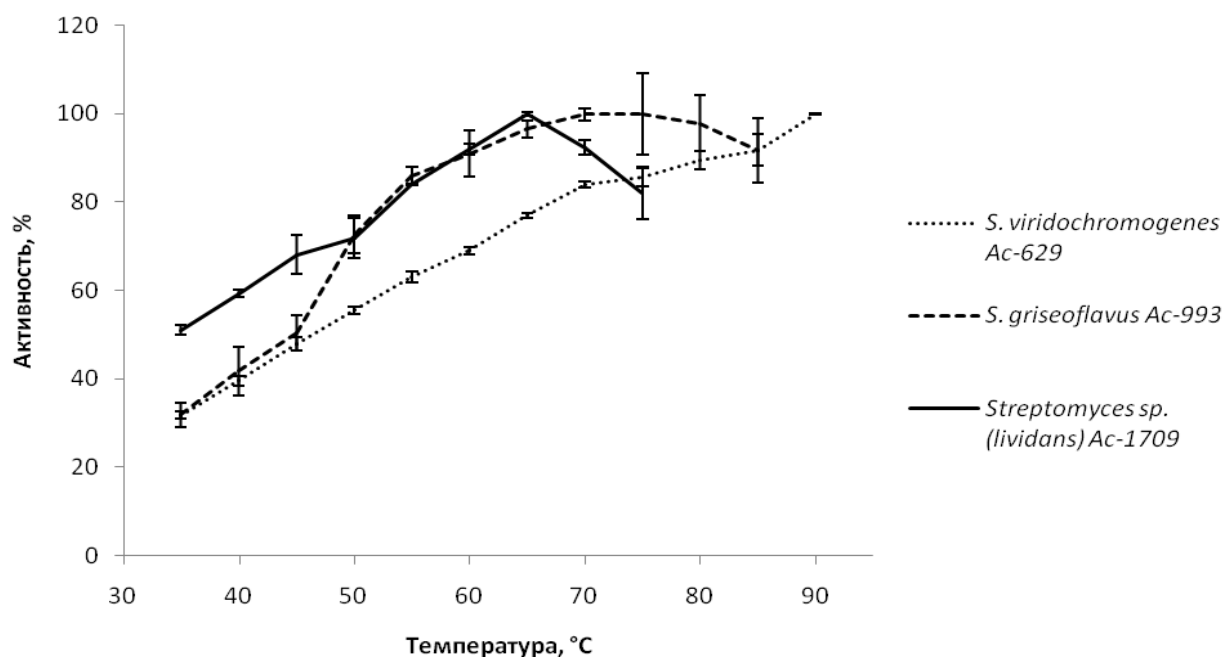


Рисунок 30. Температурные оптимумы рекомбинантных лакказ. Активность определяли по скорости окисления АБТС.

Термостабильность всех трёх ферментов была сравнительно высокой, наименее термостабильным был фермент *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, время полуинактивации которого при 60°C составляло около 1 ч (рис. 31 В). Более термостабильными были лакказы *S. griseoflavus* Ac-993 и *S. viridochromogenes* Ac-629. Лакказа из штамма Ac-993 сохраняла более 65% начальной активности при инкубировании в течение часа при 80°C. Лакказа из штамма Ac-629 сохраняла около 55% начальной активности при инкубировании в течение часа при 90°C (рис. 31 А, Б). К тому же, лакказы из штаммов Ac-993 и Ac-629 сохраняли активность при инкубировании в течение часа при 98°C (около 10% и около 40% начальной активности, соответственно).

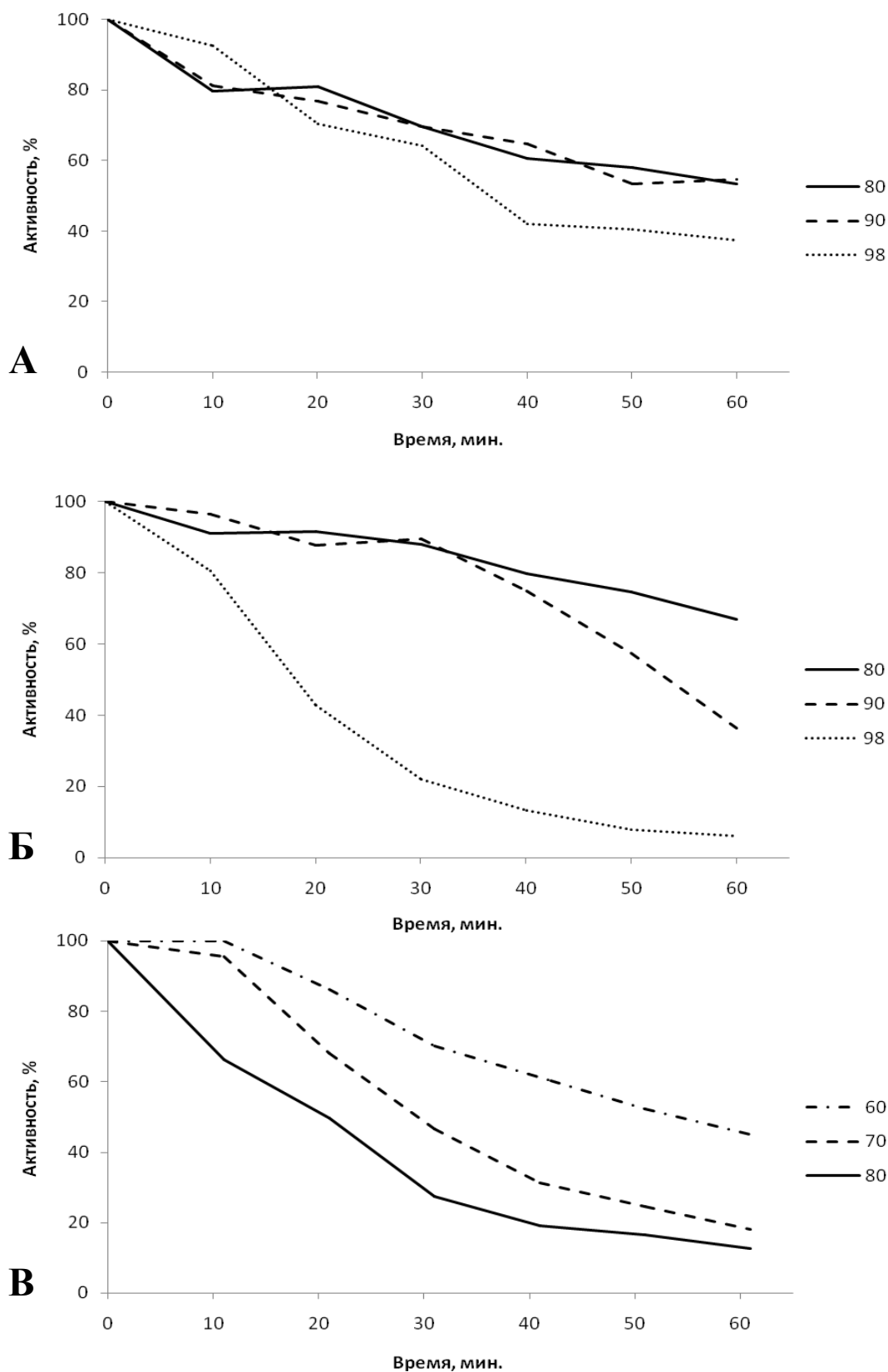


Рисунок 31. Термостабильность рекомбинантных лакказ из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629 (А), *S. griseoflavus* Ac-993 (Б) и *Streptomyces sp. (lividans)* Ac-1709 (В). 60, 70, 80, 90, 98 – температура инкубирования, °С.

3.4.3. Спектральные свойства ферментов

В спектрах поглощения всех трёх рекомбинантных лакказ присутствовал максимум поглощения при 590 нм, указывающий на наличие медного металлоцентра 1 типа, а также плечо при 330 нм, указывающее на наличие медного центра ТЗ типа (рис. 32), что является характерной особенностью спектров поглощения всех лакказ.

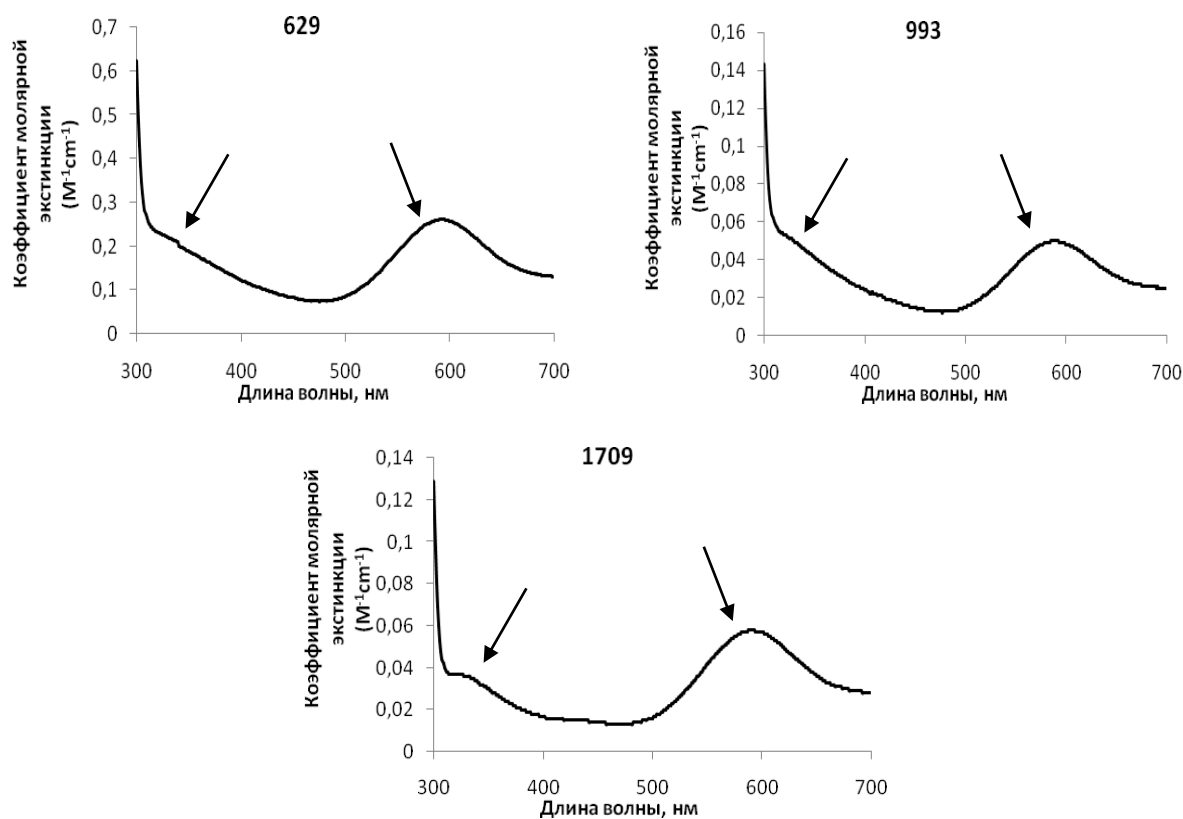


Рисунок 32. Спектры поглощения рекомбинантных лакказ из штаммов стрептомицетов. 629 – лакказа *S. viridochromogenes* Ac-629; 993 – лакказа *S. griseoflavus* Ac-993; 1709 – лакказа *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709. Максимум поглощения при 590 нм и плечо при 330 нм указаны стрелками.

3.4.4. Каталитические свойства ферментов

Были рассчитаны кинетические константы для трёх типичных субстратов лакказ: фенольного – 2,6-ДМФ (донор электронов и протонов) и нефенольных – АБТС и ферроцианида калия (органический и неорганический доноры электронов) (табл. 18).

Таблица 18.

Кинетические характеристики рекомбинантных лакказ.

Фермент	Субстрат	K_m , мМ	V_{max} , Ед/мг	k_{cat} , с ⁻¹
Лакказа <i>S. viridochromogenes</i> Ac-629	АБТС	0,79	20,6	11,6
	Ферроцианид	0,13	52,18	29,5
	2,6-ДМФ	1,68	0,89	0,5
Лакказа <i>S. griseoflavus</i> Ac-993	АБТС	0,178	21,81	12,6
	Ферроцианид	0,053	34,4	19,9
	2,6-ДМФ	0,44	0,158	0,09
Лакказа <i>Streptomyces</i> sp. (<i>lividans</i>) Ac-1709	АБТС	0,52	21,1	12,9
	Ферроцианид	0,099	52,15	32,03
	2,6-ДМФ	3,73	1,61	0,98

Также была исследована субстратная специфичность полученных рекомбинантных ферментов в отношении ряда соединений (табл. 19). Показано, что ферменты катализировали окисление фенольных субстратов с одной и двумя ОН-группами в *орто*-положении (катехол, пирогаллол) и не окисляли фенолы с ОН-группой в *пара*-положении (гидрохинон). Кроме того, лакказы катализировали окисление фенольных соединений с метокси-группой в *орто*- (2,6-ДМФ), *мета*- (феруловая кислота, ванильная кислота) и *пара*- (4-метоксифенол) положениях, и не окисляли тирозин.

Таблица 19.

Субстратная специфичность рекомбинантных лакказ.

Субстрат	Ac-1709	Ac-629	Ac-993
Феруловая кислота	-	+	+
4-метоксифенол	+	+	+
L-тирозин	-	-	-
Ванильная кислота	+	+	+
Гентизиновая кислота	+	+	+
Гидрохинон	-	-	-
2,6-диметоксифенол	+	+	+
Катехол	+	+	+
Пирогаллол	+	+	+
Сиреневая кислота	-	-	-
АБТС	+	+	+
Октацианолибдат калия	-	-	-
Ферроцианид калия	+	+	+

«+» – фермент окислял субстрат; «-» – фермент не окислял субстрат.

Исследование влияния ряда классических ингибиторов трёхдоменных лакказ показало, что в щелочных условиях азид натрия и фторид натрия не снижали активность рекомбинантных ферментов, а 1,10-фенантролин и ЭДТА ингибировали активность лакказ (табл. 20). В кислых

условиях азид натрия, фторид натрия, а также 1,10-фенантролин оказались эффективными ингибиторами всех трёх лакказ, ЭДТА снижал активность лакказ *S. viridochromogenes* Ас-629 и *Streptomyces sp. (lividans)* Ас-1709 (табл. 20).

Активность 2д лакказ подавлялась в различной степени некоторыми ионами металлов: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} и Na^{+} . Исключение составляла лакказа *Streptomyces sp. (lividans)* Ас-1709, активность которой незначительно увеличивалась в присутствии 1 мМ $MgSO_4$ и $CuSO_4$ (табл. 21)

Таблица 20.

Влияние ингибиторов на активность рекомбинантных лакказ.

Белок	Конц-я	Кислые значения pH (4,0-4,5)				Щелочные значения pH (8,0-9,0)			
		NaN ₃	NaF	1,10-Ф	ЭДТА	NaN ₃	NaF	1,10-Ф	ЭДТА
629	1 мМ	81,6*	92,5	70,9	85,52	105,6	100,2	59,8	78,2
	10 мМ	37,4	75	17,2	15,38	113,6	99,1	37,3	84
	100 мМ	5,8	13,2	-	-	137,1	118,8	-	1
993	1 мМ	86,9	102,4	102,5	96	98	92,9	84,4	90,6
	10 мМ	51,9	124,6	30,9	142	105,1	100,6	54,9	9,6
	100 мМ	7,2	27,6	5,9	142,7	123,2	115,5	18,3	0
1709	1 мМ	81,4	95,2	73,4	97	-	109,8	33,2	35,9
	10 мМ	39,2	65,8	21,1	84,9	109,7	116,8	21,2	48,2
	100 мМ	5,35	20	2,1	46,4	109	154,2	6	72,5

* – цифрами обозначена остаточная активность ферментов в %.

Таблица 21.

Влияние ионов металлов на активность рекомбинантных лакказ.

Белок	Конц-я	MgSO ₄	MgCl ₂	CaCl ₂	CoCl ₂	ZnSO ₄	FeCl ₃	CuSO ₄	NaCl
629	1 мМ	101,2*	98,2	94,8	95,4	97,2	60,2	95,2	99,4
	10 мМ	94,3	74,7	72,7	73,3	н/о ^{н/р}	0	59,5 ^{ос}	84,6
	100 мМ	79,3	н/о ^{ос}	н/о	н/о ^{ос}	н/о	н/о	н/о ^{ос}	48,2
	1 М	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	16,1
993	1 мМ	97,4	100,5	69,3	102,4	94,9	34,2	48,8	94,3
	10 мМ	95,8	78,5	68,1	81,5	н/о ^{н/р}	0	25,6 ^{ос}	91,6
	100 мМ	84,1	н/о ^{ос}	н/о	н/о ^{ос}	н/о	н/о	н/о ^{ос}	52,5
	1 М	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	16,9
1709	1 мМ	108,3	91,3	93,7	94,7	93	58,5	111,9	97,6
	10 мМ	101,9	65,6	72,1	73,1	н/о ^{н/р}	3,4	74,3 ^{ос}	82,1
	100 мМ	87,4	н/о ^{ос}	н/о	н/о ^{ос}	н/о	н/о	н/о ^{ос}	39
	1 М	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	13,1

* – цифрами обозначена остаточная активность ферментов в %; ос – наблюдалось выпадение осадка; н/о – активность не определяли; н/р – отсутствовала полная растворимость соли.

3.5. Кристаллизация рекомбинантных лакказ

С препаратами лакказ *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993, клонированных с сигнальным пептидом, были получены микрокристаллы, непригодные для рентгеноструктурного анализа (рис. 33 А, Б). При кристаллизации лакказы *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 с сигнальным пептидом были получены крупные кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа (рис. 33 В).

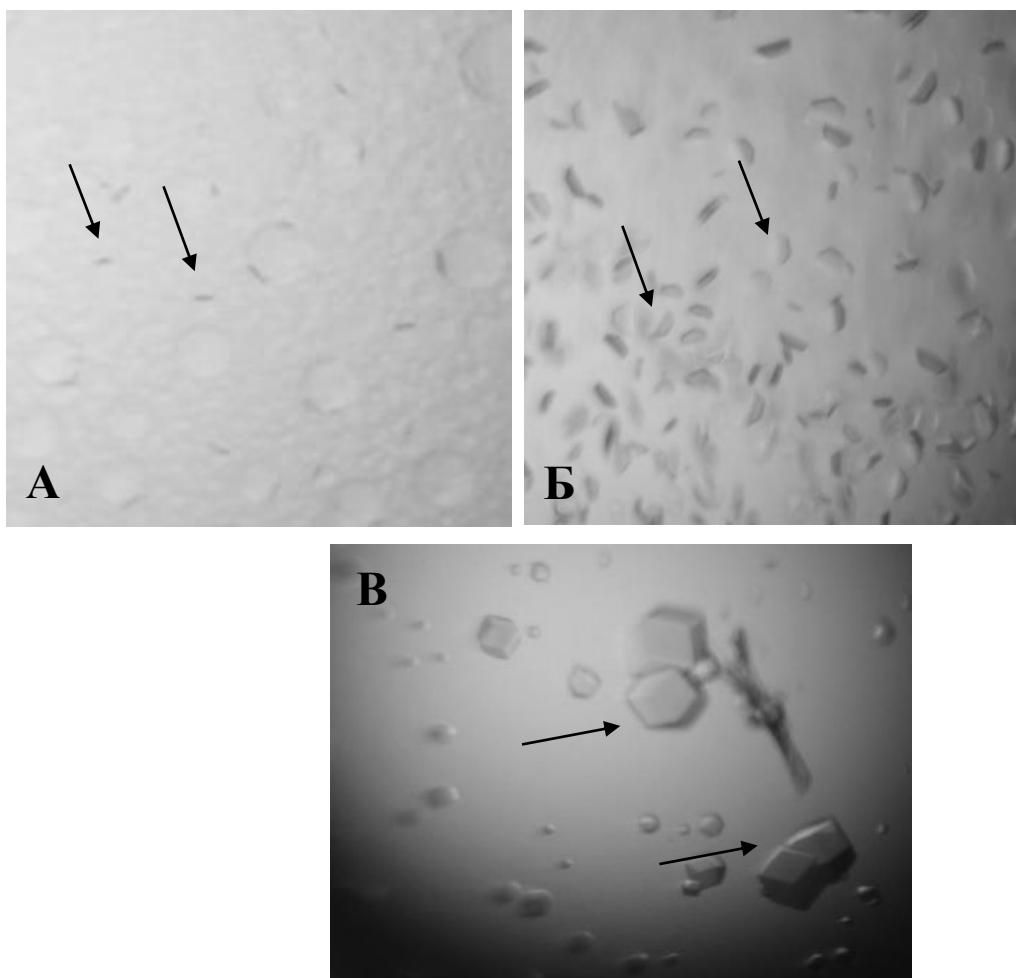


Рисунок 33. Кристаллы рекомбинантных лакказ с сигнальным пептидом из *S. viridochromogenes* Ac-629 (А), *S. griseoflavus* Ac-993 (Б) и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 (В). Стрелками указаны кристаллы.

Удаление сигнального пептида у рекомбинантных белков из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 способствовало формированию крупных кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа (рис. 34 А, Б).

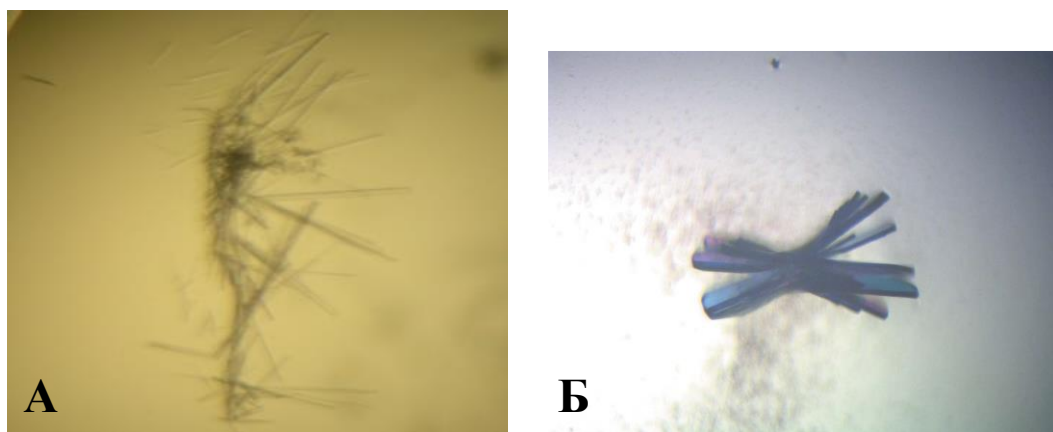


Рисунок 34. Кристаллы рекомбинантных лакказ без сигнального пептида из *S. viridochromogenes* Ac-629 (А) и *S. griseoflavus* Ac-993 (Б).

Перед кристаллизацией белки были переведены в буфер с рН 9,0. Кристаллы лакказ *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 были прочитаны с разрешением 2,4 и 2,0 Å, соответственно. Рентгеноструктурный анализ полученных кристаллов лакказ Ac-629 и Ac-993 показал, что оба белка представляют собой гомотримеры (рис. 35 А, Б). В конфигурации каждой лакказы можно выделить два купредоксиновых домена, построенных на основе восьми консервативных β-структур. Каждый мономер в структуре тримера несёт по 4 атома меди в активном центре. Таким образом, можно с точностью сказать, что охарактеризованные рекомбинантные белки представляют собой лакказы, состоящие из двух доменов.

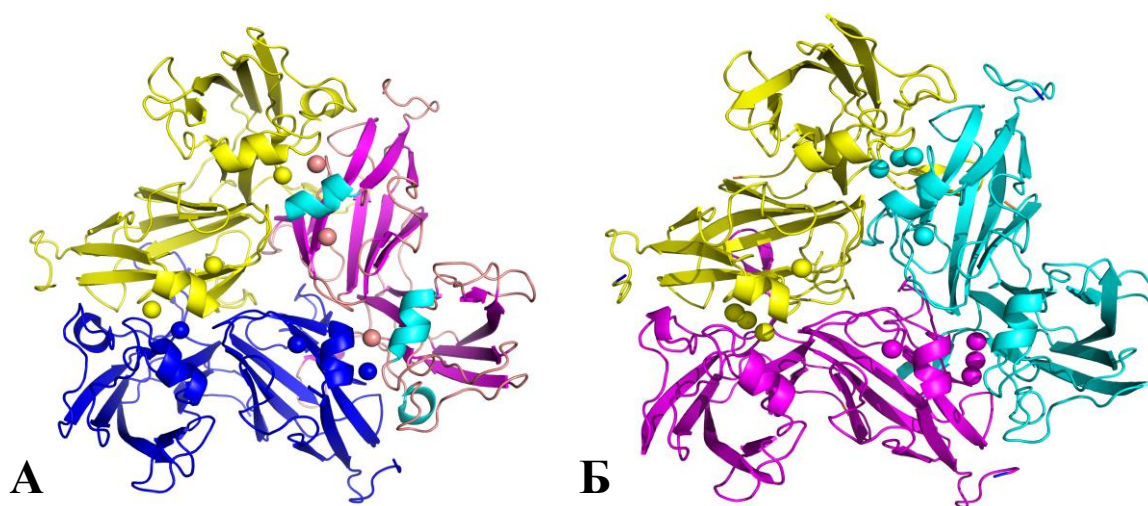


Рисунок 35. Структуры лакказ из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629 (А) и *S. griseoflavus* Ac-993 (Б). Мономеры в структуре тримера выделены разными цветами. Окрашенные сферы – атомы меди. Стрелки и спирали – β-складчатости и α-спирали в структуре белков.

Также были получены кристаллы лакказы из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 с азидом натрия с разрешением 2,4 Å (рис. 36 А, Б). Установлено, что азид натрия не связывается с Т2/Т3-центром 2д лакказы, а расположен на расстоянии 5,5 Å от Т1-центра.

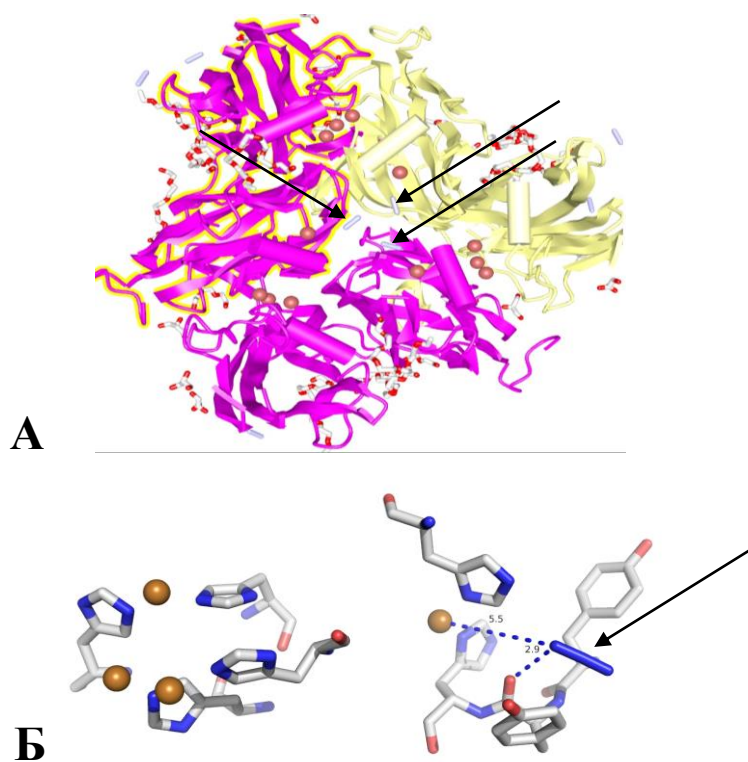


Рисунок 36. Структура лакказ из штамма *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 (А). Детальная локализация азид натрия относительно металлоцентров (Б). Мономеры в структуре тримера выделены разными цветами. Оранжевые сферы – атомы меди. Азид натрия указан стрелками.

3.6. Обесцвечивание трифенилметановых красителей

Все три рекомбинантные лакказы, изучаемые в нашей работе, не окисляли трифенилметановые красители: малахитовый зелёный, бриллиантовый зелёный и фуксин (рис. 37). Оказалось, что в условиях инкубирования рекомбинантных лакказ в паре с 50 мкМ медиаторами в течение 24 ч при комнатной температуре, АБТС вызывал обесцвечивание 50 мкМ растворов красителей (рис. 38, 39, 40).

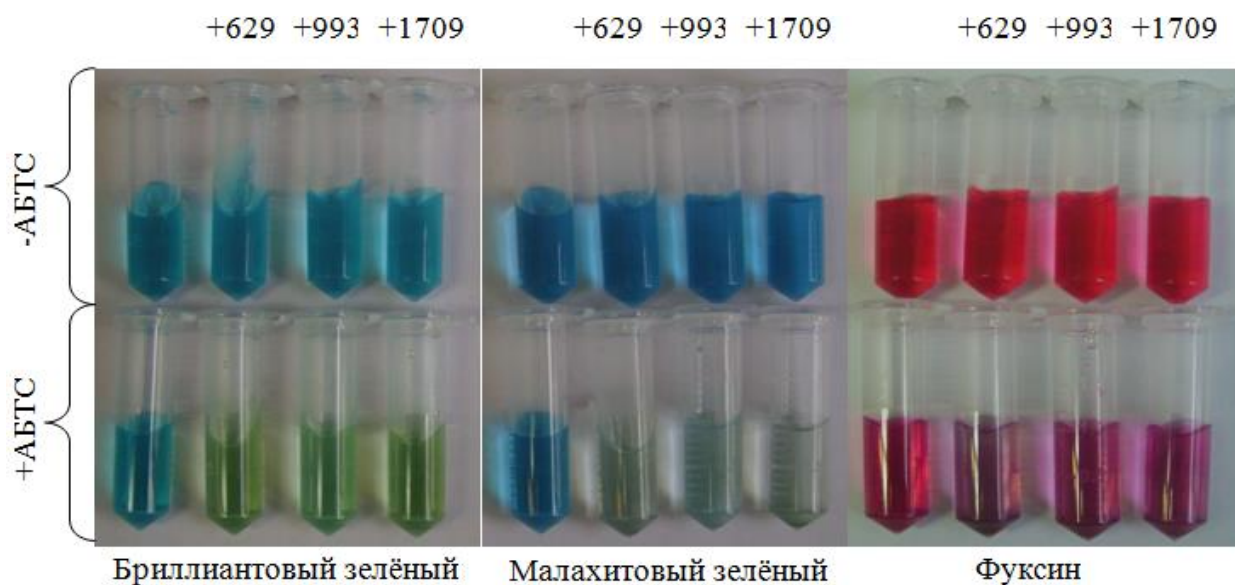


Рисунок 37. Обесцвечивание 50 мкМ красителей рекомбинантными лакказами. «-АБТС» – раствор красителя без АБТС, «+АБТС» – краситель с внесением АБТС, «+629» – краситель с внесением белка из штамма *S. viridochromogenes* Ac-629, «+993» – краситель с внесением белка из штамма *S. griseoflavus* Ac-993, «+1709» – краситель с внесением белка из штамма *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709.

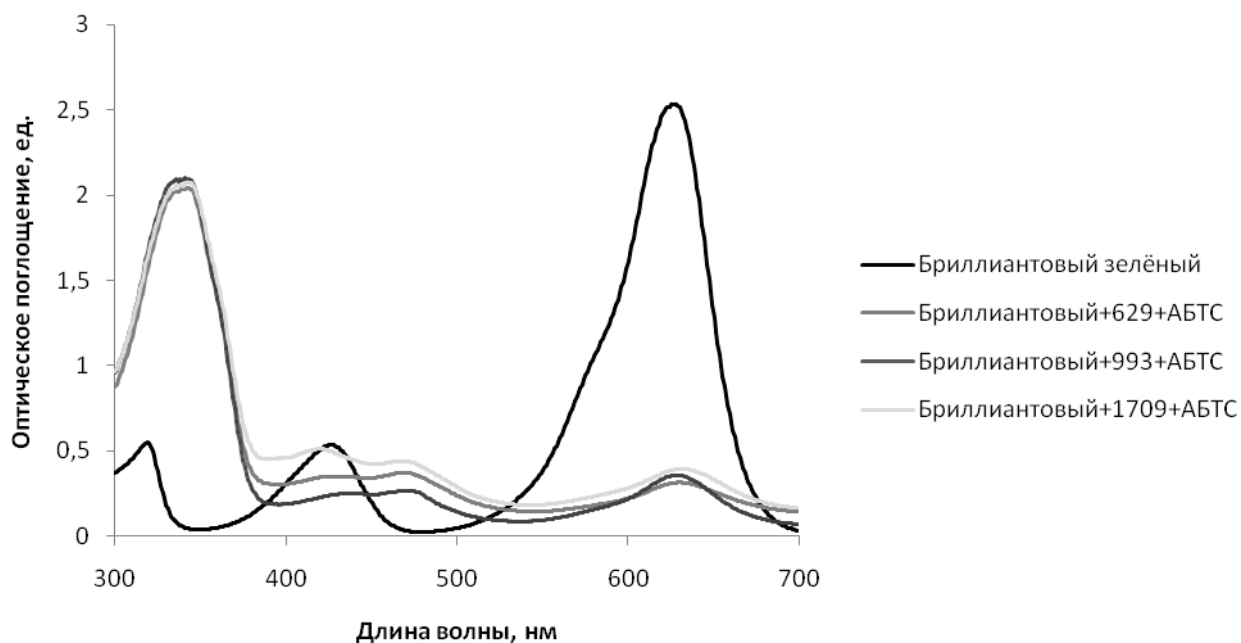


Рисунок 38. Изменение спектра поглощения красителя бриллиантовый зелёный в присутствии пары лакказа/медиатор. Обозначения как в рис. 37.

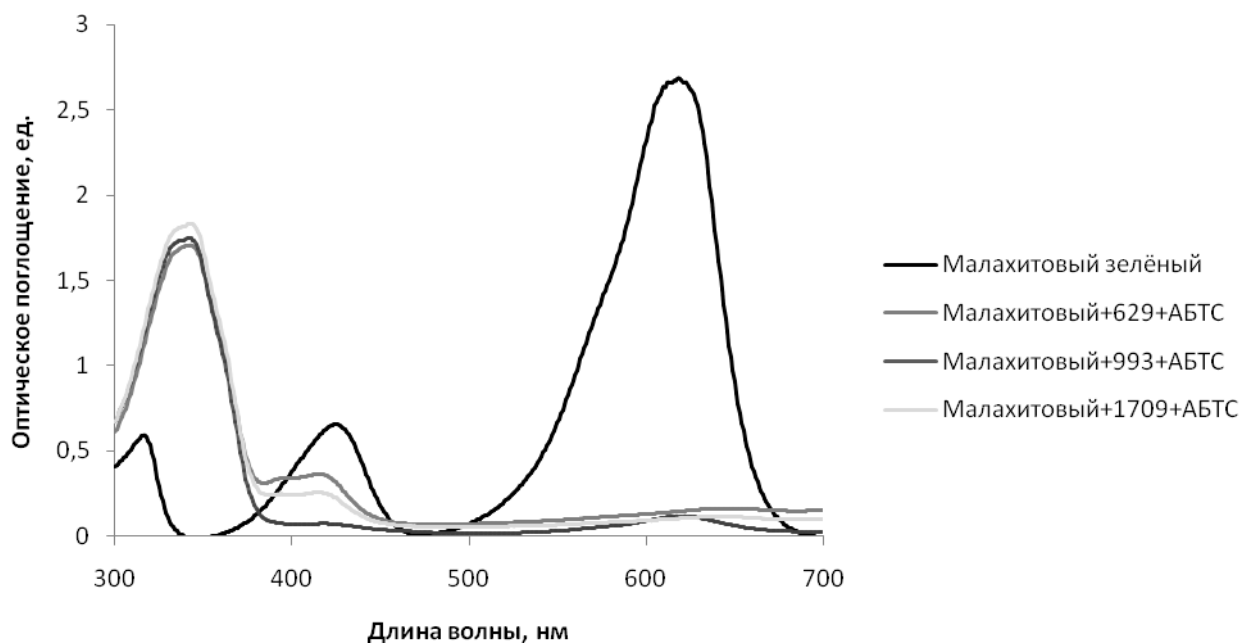


Рисунок 39. Изменение спектра поглощения красителя малахитовый зелёный в присутствии пары лакказа/медиатор. Обозначения как в рис. 37.

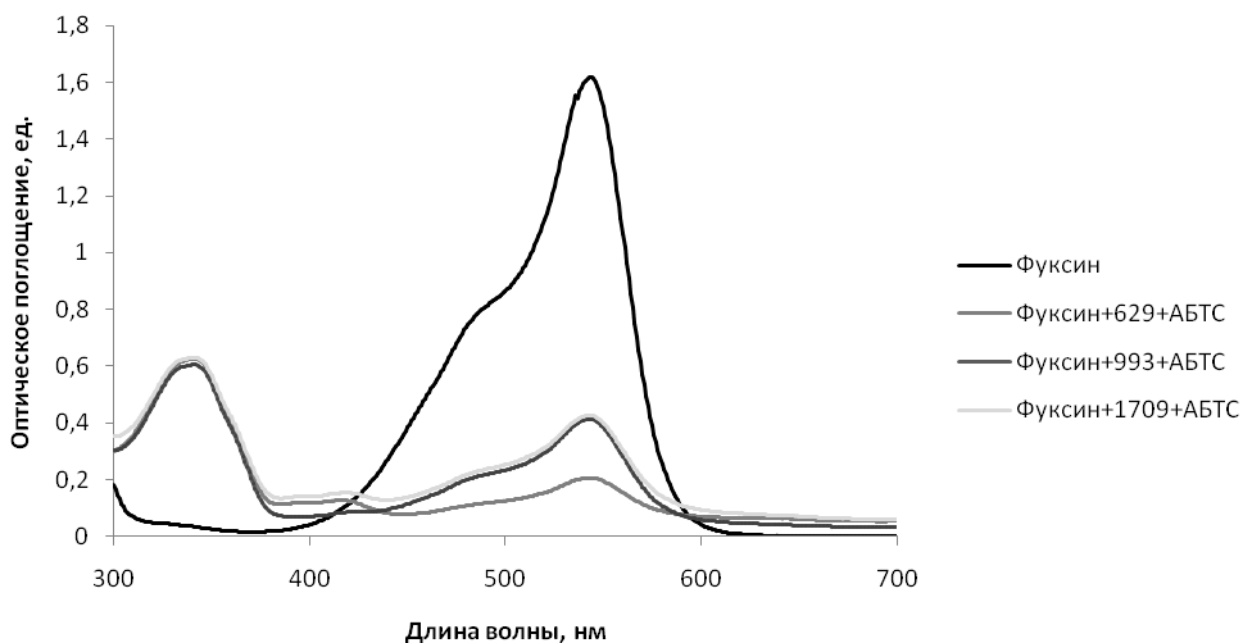


Рисунок 40. Изменение спектра поглощения красителя фуксин в присутствии пары лакказа/медиатор. Обозначения как в рис. 37.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Выбор объектов исследования и методики работы

Для работы были выбраны штаммы, в геномах которых обнаруживали гены только 2д лакказ (*S. viridochromogenes* Ac-629, *S. hygrosopicus* Ac-831, *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-235, *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709), а также штамм – носитель генов как 2д, так и 3д лакказы (*S. griseoflavus* Ac-993).

Из литературы известны два основных подхода для получения 2д фермента: оптимизация среды культивирования микроорганизма для увеличения продукции лакказы (в случае внеклеточной секреции или внутриклеточного синтеза фермента), и – клонирование гена, кодирующего лакказу, с его последующей экспрессией (особенно, в случае локализации лакказы в структуре клеточной оболочки вегетативной клетки или споры). Имеющиеся данные по использованию оптимизации среды культивирования для увеличения выхода 2д лакказ весьма ограничены. Так, для изучения продукции EroA *S. griseus* использовалась агаризованная среда Беннета с добавлением 10 мМ CuSO₄, как индуктора (Endo *et al.*, 2002). Продукция SilA штаммом *S. ipomoea* наблюдалась при культивировании на минимальной минеральной среде с добавлением галактоманнана, как источника углерода, и аспарагина, как источника азота (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). Для продукции 3д лакказ использовали культивирование на богатых средах, либо внесение меди в качестве индуктора (Lu *et al.*, 2012, Sheikhi *et al.*, 2012).

В нашей работе с целью обнаружения синтеза и последующего повышения выхода вне- или внутриклеточных 2д лакказ мы учитывали известные условия успешных экспериментов по получению лакказ. Так, изучаемые штаммы мы культивировали на богатой среде с добавлением микроэлементов, в том числе Cu²⁺ (среда для определения активности лакказы, п. 2.1.2.) в течение 5 сут. Отбор проб на активность лакказы проводили каждые сутки. Не было обнаружено ни внеклеточной, ни внутриклеточной активности ферментов. Поэтому дальнейшая работа была направлена на клонирование генов 2д лакказ.

4.2. Клонирование и экспрессия генов 2д лакказ

Продукты ПЦР-амплификации, полученные с геномных ДНК штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629, *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-235, *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, *S. griseoflavus* Ac-993 и плазида pAL-TA были лигированы. Определение нуклеотидной последовательности вставок подтвердило факт наличия генов 2д лакказ. Для штамма *S.*

hygroscopicus Ac-831 продукта ПЦР с праймерами для клонирования (табл. 10) получено не было. Изменения условий амплификации, таких как подбор оптимальной температуры отжига, использование различных концентраций Mg²⁺ или матрицы, результатов не дало (данные не представлены). Поэтому дальнейшая работа со штаммом *S. hygroscopicus* Ac-831 не проводилась. Известно, что базы данных по генам и геномам постоянно обновляются и дополняются. Мониторинг последних выявил, что ген, идентифицированный нами как 2д лакказы из штамма *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653 позднее был перекалфицирован как 2д лакказы из штамма *S. himastatinicus* WP_009712776.1. Поэтому разработанная пара праймеров не подходила для амплификации 2д лакказы из штамма Ac-831.

Для штаммов *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-235 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 полученные аминокислотные (а.к.) последовательности были полностью идентичны, а также идентичны последовательности 2д лакказы из штамма *S. lividans* ТК24. Однако а.к. последовательности лакказ из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 отличались от а.к. последовательностей лакказ из штаммов *S. viridochromogenes* DSM 40736 и *S. griseoflavus* Tu4000 (рис. 20 А, Б, В). А.к. последовательности обоих ферментов были короче в сравнении с а.к. последовательностями лакказ из *S. viridochromogenes* DSM 40736 и *S. griseoflavus* Tu4000 (Ac-629 – 313 п.о. против 325 п.о. и Ac-993 – 322 п.о. против 328 п.о.), и характеризовались делециями на С-концевом участке и небольшими инсерциями в последовательности сигнального пептида. Консервативные медь-связывающие остатки присутствовали во всех аминокислотных последовательностях.

Для экспрессии генов 2д лакказ была использована плаزمида pQE-30 и штамм *E. coli* M15(pREP4). В данной плазмиде ген размещается под контролем сильного T5-промотора. Для экспрессии практически всех описанных 2д лакказ использовалась система вектор – рЕТ и штамм – *E. coli* (DE3). В данной системе ген помещается под контроль T7-промотора, который идентифицируется исключительно фаговой T7-РНК-полимеразой. В ходе данной работы выход белков, полученных с 1 л среды, составил 8-10 мг. Для сравнения, выход белка ЕрoА составлял 1,1 мг с 3 л среды (Endo *et al.*, 2003), Ssl1 – 40-50 мг с 1л среды (Gunne and Urlacher, 2012). Самый большой выход 2д лакказы SLAC – 350 мг с 1л среды – был получен при гомологичной экспрессии гена (Dube *et al.*, 2008). Самый высокий выход 3д бактериальной лакказы – 1,2 г белка с 1л среды – был получен при экспрессии гена в штамме *P. pastoris*. Количества белка, полученных в данной работе при выделении ферментов, было достаточным для проведения биохимических исследований, а также для кристаллизации ферментов.

Так как 2д лакказы являются медьсодержащими белками, для формирования активной формы фермента необходимо наличие ионов меди. Ранее существовали 2 подхода для

получения активной формы фермента при продукции лакказ. Первый – внесение ионов меди в индукционную среду в процессе экспрессии в гетерологичной системе. Второй – диализ полученного рекомбинантного апофермента против буфера с ионами меди. Позднее Duraó с коллегами установили, что наличие ионов меди при продукции рекомбинантной лакказы необходимо для формирования правильной структуры T2/T3-медного центра (Duraó *et al.*, 2008). Авторами было показано, что в микроаэробных условиях клетки накапливают в 80 раз больше ионов меди, чем в аэробных, и для получения активной фракции рекомбинантной лакказы, полностью насыщенной медью, необходимо вносить в среду ионы меди и проводить индукцию в микроаэробных условиях. Мы использовали данный подход для получения активных 2д лакказ: при достижении культурами бактерий оптической плотности OD₆₀₀ 0,3-0,4 ед. проводилось внесение индуктора ИПТГ и ионов меди в концентрации 0,25 мМ CuSO₄. Дальнейшее культивирование продуцентов проводилось при замедленном перемешивании – 0-50 об/мин для снижения концентрации кислорода в среде (п. 3.3.).

Склонность рекомбинантных белков к агрегированию была продемонстрирована для ряда 3д бактериальных лакказ. Так, CotA из *B. subtilis* и STSL из *S. lavendulae* агрегировали в процессе индукции (Martins *et al.*, 2002, Suzuki *et al.*, 2003). В нашей работе агрегировали белки из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993. Изначально была проведена очистка агрегировавших белков в денатурирующих условиях (буфер с 8 М мочевиной) на колонке с Ni-сефарозой. Полученные в результате очистки белки не обладали ферментативной активностью. Попытки провести рефолдинг белков не дали результата. В результате серии последовательных диализов белков в буфере с понижением концентрации мочевины оба белка выпадали в осадок (данные не представлены). Однако снижение концентрации индуктора до 0,1 мМ а также снижение температуры до 18°C во время индукции устраняли эффект агрегирования. Весь белок был идентифицирован в растворимой фракции после дезинтеграции. Такой положительный эффект может быть обусловлен более низкой скоростью синтеза фермента, и, как следствие, правильным фолдингом и отсутствием агрегирования. Было установлено, что белок Lac15 с «гистидиновым хвостом» на С-конце был склонен к агрегированию, в то время как удаление гистидинов снимало негативный эффект (Fang *et al.*, 2014). Вероятно, и в данном случае наличие гистидинов у рекомбинантных лакказ могло вносить определённый вклад в агрегирование ферментов при температуре 37°C. Однако, внедрение «гистидинового хвоста» обеспечивает одностадийную очистку белка, что существенно облегчает получение фермента.

4. 3. Очистка и характеристика 2д лакказ

Установлено, что гены 2д бактериальных лакказ, относящихся к типу В и С (п. 1.4.) широко распространены среди бактерий (Ausec *et al.*, 2011). Однако охарактеризовано всего шесть ферментов, относящихся к группе В, и только один фермент, относящийся к группе С. Лакказы, исследованные в данной работе, относятся к группе В. В связи с этим 2д лакказа с нитрит-редуктазной активностью из *Nitrosomonas europaea* (DiSpirito *et al.*, 1985), относящаяся к группе С, не рассматривалась в данной работе при сравнительной характеристике 2д лакказ.

Вопрос о влиянии сигнального пептида на активность рекомбинантных лакказ является предметом дискуссии. Лакказа Ер0А была экспрессирована с последовательностью сигнального пептида. Фермент был активен, причём свойства рекомбинантной лакказы не отличались от свойств нативного фермента (продуцированного штаммом-носителем лакказного гена) (Endo *et al.*, 2003). 2д Лакказы SilA из *S. ipomoea* и LMCO из *S. pristinaespiralis* были экспрессированы с последовательностью сигнального пептида и проявляли активность (Molina-Guijarro *et al.*, 2009; Ihssen *et al.*, 2015). Однако для фермента LMCO было показано, что удаление сигнального пептида приводило к потере активности. Ферменты MCO из *S. griseorubens*, SLAC из *S. coelicolor* и Ssl1 из *S. sviveus* были экспрессированы без последовательности сигнального пептида и проявляли активность (в случае SLAC имела место гомологичная экспрессия) (Dube *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2015; Gunne and Urlacher, 2012). Однако фермент Ssl1, экспрессированный с сигнальным пептидом, был неактивен. Таким образом, описаны 2д лакказы, активные: 1) только при наличии сигнального пептида; 2) только в отсутствие сигнального пептида; 3) и с сигнальным пептидом, и без него. Тот факт, что 2д лакказы являются внеклеточными ферментами, секретируемыми по ТАТ-пути, ставит под сомнение данные о том, что 2д лакказа LMCO неактивна без сигнального пептида. Однако авторы работы ссылаются на, вероятно, неверно спрогнозированный сайт, по которому прошло удаление сигнального пептида. В нашей работе рекомбинантные лакказы были экспрессированы в двух вариантах: и с последовательностью сигнального пептида, и без него. Лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 были активны в обоих случаях, причём свойства рекомбинантных ферментов практически не различались (данные не представлены). Лакказа из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 также была активна в обоих вариантах, однако фермент без сигнального пептида был нестабилен: при хранении наблюдался протеолиз белка. Таким образом, отсутствие сигнального пептида является скорее желательным, хотя и не обязательным фактором для получения активной 2д лакказы. Наличие сигнального пептида в большинстве случаев не влияет на активность рекомбинантных ферментов.

На основании свойств охарактеризованных бактериальных 2д лакказ, были сформированы следующие представления о данной группе ферментов (табл. 22):

1) представляют собой гомотримеры, активны в форме гомотримеров и имеют характерный спектр поглощения с максимумом при 590 нм и плечом при 330 нм;

2) имеют кислый и щелочной оптимумы окисления нефенольных (АБТС) и фенольных (2,6-ДМФ) субстратов, соответственно, и более стабильны при нейтральных-щелочных значениях pH;

3) сохраняют до 50% начальной активности при инкубировании более часа при 70°C, температурный оптимум варьируется от 40 до 60°C;

4) обладают необычной для 3д лакказ устойчивостью к ингибиторам, в частности к азиду натрия.

Бактериальные лакказы, охарактеризованные в данной работе, имели следующие признаки, характерные для всех представителей группы 2д лакказ: ферменты из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629, *S. griseoflavus* Ac-993 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 представляли собой гомотримеры. Все три лакказы были активны только в форме гомотримеров. Спектры поглощения белков были типичными для 2д лакказ (с максимумом при 590 нм и плечом при 330 нм). Значение молекулярной массы мономерных форм белков хорошо коррелировало с теоретически рассчитанной молекулярной массой: 41,5 кДа, 37,3 кДа и 40,5 кДа против 35,3 кДа, 36,1 кДа и 38,3 кДа (для белков из Ac-629, Ac-993 и Ac-1709, соответственно) (Юревич *и др.*, 2012; Юревич *и др.*, 2015; Trubitsina *et al.*, 2015).

Так же, как и описанные ранее 2д лакказы, лакказы из нашей работы были более стабильны при щелочных значениях pH. Фермент из *S. viridochromogenes* Ac-629 сохранял около 75% начальной активности при pH 9,0 и более 80% при pH 11,0. Фермент из *S. griseoflavus* Ac-993 сохранял около 70% начальной активности при pH 7,0 и 9,0. Фермент из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 сохранял более 80% начальной активности при pH 11,0. Оптимумы окисления нефенольных и фенольных субстратов лежали в кислой и щелочной области pH, что коррелировало с данными, полученными для других 2д лакказ (табл. 22). Колоколообразную форму профиля зависимости активности от pH 2д лакказ при окислении нефенольных соединений можно объяснить высокой нестабильностью ферментов при pH < 4,0. И при преодолении данной точки нестабильности активность возрастает, а затем вновь начинает падать за счёт возрастающего ингибирующего действия OH-ионов.

Температурные оптимумы охарактеризованных нами лакказ были заметно выше значений, известных для ферментов – представителей группы 2д лакказ (табл. 22). Они составили 65°C, 75°C и более 90°C для лакказ из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, *S.*

griseoflavus Ac-993 и *S. viridochromogenes* Ac-629, соответственно. В отношении термостабильности, 2д лакказы из *S. griseoflavus* Ac-993 и *S. viridochromogenes* Ac-629 были гораздо более термостабильны, чем фермент из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, описанный в данной работе, и более термостабильны, чем описанные ранее 2д лакказы. Оба фермента (из *S. griseoflavus* Ac-993 и *S. viridochromogenes* Ac-629) проявляли остаточную активность после кипячения в течение 1 часа. Однако самой термостабильной 2д лакказой оказался фермент из *S. viridochromogenes* Ac-629, сохраняющий 40% активности после кипячения 1 ч (Trubitsina *et al.*, 2015). Известна работа по исследованию термостабильности лакказы SLAC из *S. coelicolor* A3(2) (Sherif *et al.*, 2013), где время полуинактивации фермента при 100°C составляло около часа. Однако достоверность полученных данных вызывает сомнения. Во-первых, данные не согласуются с полученными ранее значениями термостабильности SLAC, согласно которым фермент за 10 минут кипячения терял 90% начальной активности (Dube *et al.*, 2008), а также с результатами, полученными в данной работе. В статье не указано, какой именно фермент (с последовательностью или без последовательности сигнального пептида) исследуется. К тому же не указано, исследовались ли свойства фермента, полученного при культивировании в аэробных, или к микроаэробных условиях.

Субстратная специфичность была наиболее полно изучена для LMCO из *S. pristinaespiralis* (91 тестовый субстрат) и SilA из *S. ipomoea* (36 тестовых субстратов). Ферменты, охарактеризованные нами, так же, как и большинство 2д лакказ, помимо универсальных субстратов (АБТС и 2,6-ДМФ), были способны окислять ферроцианид калия (табл. 19). Как и фермент SilA, лакказы из данной работы окисляли 4-метоксифенол, катехол, однако не окисляли сиреневую кислоту, которая окислялась SilA, но могли окислять ванильную кислоту, не окисляемую SilA. Подобно LMCO из *S. pristinaespiralis*, лакказы окисляли пирогаллол, феруловую кислоту (кроме лакказы из Ac-1709), однако LMCO не окисляла катехол, окисляемый лакказами из данной работы. Таким образом, можно сказать, что, помимо универсальных субстратов, все 2д лакказы способны окислять большое разнообразие соединений фенольной и нефенольной природы. Отдельно стоит отметить, что 2д лакказы относятся к низко-редокспотенциальным ферментам (0,37-0,5 мВ), поэтому способность окислять тот или иной субстрат ограничивается их ОВП. Известно, что ОВП фенольных субстратов изменяется в диапазоне рН. Чем выше значение рН, тем ниже ОВП фенольного соединения (Penketh, 1957). Именно поэтому большинство 2д лакказ окисляют 2,6-ДМФ в щелочных условиях, в которых ОВП составляет 0,42 мВ и не окисляют при кислых значениях рН (при ОВП субстрата 0,99 мВ) (Jovanovic *et al.*, 1991). Универсальный субстрат АБТС окисляется 2д лакказами со скоростью 7,38-9,9 молекул субстрата за секунду (K_m 0,36-2,9 мМ),

2,6-ДМФ – со скоростью 0,32-4,2 молекул субстрата за секунду (K_m 0,5-4,27 мМ) (табл. 22). Если сравнивать известные значения с полученными нами результатами, лакказы из *S. griseoflavus* Ас-993 окисляла 2,6-ДМФ с более низкой скоростью, чем остальные лакказы ($k_{cat} = 0,1 \text{ c}^{-1}$), однако имела более высокое сродство к субстрату ($K_m = 0,44 \text{ мМ}$). Остальные лакказы попадали в известный диапазон значений. Касательно АБТС, K_m охарактеризованных лакказ попадала в диапазон известных значений, кроме лакказы из *S. griseoflavus* Ас-993 ($K_m = 0,178$), однако все ферменты окисляли данный субстрат с более высокой скоростью ($k_{cat} = 11,6-12,9 \text{ c}^{-1}$) (табл. 18).

Известно, что азид натрия является сильным ингибитором 3д грибных лакказ. Концентрация азидата натрия 0,1 мМ полностью ингибирует активность грибной лакказы (п. 1.5.2.). Бактериальные 3д лакказы ингибируются азидом натрия в меньшей степени. Полное ингибирование может вызвать концентрация азидата до 10-20 мМ включительно (Arias *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2015). Ранее для 2д лакказ было показано, что для них так же, как и для 3д лакказ бактерий, азид натрия не является сильным ингибитором. Остаточная активность различных 2д лакказ при концентрации азидата натрия 1 мМ составляла 68-100%, при концентрации 10 мМ – 60-95%. Причём, как это было хорошо продемонстрировано на примере лакказы SilA из *S. ipomoea*, существовала зависимость степени ингибирования лакказы от величины рН. При кислых значениях рН лакказа сильнее ингибировалась азидом натрия, чем при щелочных значениях рН (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). В нашей работе также наблюдалась зависимость влияния ингибитора от величины рН (табл. 20). Однако, если при кислых значениях рН наблюдалось ингибирование исследуемых лакказ азидом и фторидом натрия, то при щелочных значениях рН ингибирующий эффект отсутствовал. Причём, при концентрации ингибиторов 100 мМ, наблюдалось повышение активности лакказ (табл. 20). Для фермента SilA сходный эффект был показан в отношении NaCl (при рН 5,0 лакказа ингибировалась, а при рН 8,0 активировалась хлоридом натрия), однако объяснения такому эффекту авторы не дали. ЭДТА, являющаяся хелатирующим агентом, снижала активность известных 2д лакказ при щелочных значениях рН (табл. 8). При кислых значениях рН эффект ингибирования был незначителен или отсутствовал. Лакказы из нашей работы также ингибировались ЭДТА при рН 8,0-9,0. Но при рН 4,0-4,5 только лакказа из *S. griseoflavus* Ас-993 не ингибировалась ЭДТА. Остальные ферменты теряли активность в присутствии ЭДТА при кислых значениях рН. Ингибитор 1,10-фенантролин, подобно ЭДТА удаляющий атомы меди из активного центра лакказы, был самым эффективным ингибитором исследованных нами лакказ. Он снижал активность ферментов и при щелочных, и при кислых значениях рН. Ранее влияние данного ингибитора на активность 2д лакказ исследовано не было.

Ионы металлов по-разному влияли на активность исследованных нами лакказ (табл. 21). Наибольший ингибирующий эффект оказывали ионы Fe^{3+} и Cu^{2+} , что согласуется с данными по влиянию ионов металлов на активность лакказы SilA из *S. ipomoea*. Исключение – лакказа из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, которая, подобно 2д лакказе из *S. griseorubens*, активировалась ионами Cu^{2+} в концентрации 1мМ. Лакказа МСО также ингибировалась ионами железа, правда в меньшей степени. В отношении других металлов нельзя выявить конкретной закономерности. Разные ионы по-разному влияют на активность 2д лакказ (оказывают в разной степени ингибирующий, активирующий эффект или не оказывают эффекта вообще). Отдельно стоит отметить, что исследованные лакказы, подобно SilA, являлись галотолерантными ферментами и сохраняли остаточную активность при 1М NaCl. (табл. 21).

Таблица 22.

Сравнительная характеристика 2д бактериальных лакказ.

Фермент, (штамм), ссылка	ММ, кДа	pH-оптимум	pH- стабильность	Температурный оптимум, °С	Термостабильность	Кинетика
SLAC (<i>S. coelicolor</i>) (Dube <i>et al.</i> , 2008)	32	АБТС – 4,0; 2,6-ДМФ – 9,0	3-9	60	50% – при 70°С за 110 мин	н/о
MCO (<i>S. griseorubens</i>) (Feng <i>et al.</i> , 2015)	33,9	АБТС – 4; 2,6-ДМФ – 9; гваякол – 10; сирингальдазин – 8	7-11	н/о	33% – при 80°С за 2 ч; 52% – при 70°С за 2 ч	АБТС: K _m – 2,9 мМ, k _{cat} – 7,68 с ⁻¹ 2,6-ДМФ: K _m – 1,16 мМ, k _{cat} – 0,336 с ⁻¹
EpoA (<i>S. griseus</i>) (Endo <i>et al.</i> , 2003)	38 / 114	ДМП – 6,5	н/о	40	40% – при 70°С за 1 ч; 20% – при 80°С за 1 ч	ДМП: K _m – 0,42 мМ
SilA (<i>S. ipomoea</i>) (Molina-Guijarro <i>et al.</i> , 2009)	44,7 / 79	АБТС – 5; <i>n</i> -диаминобензен – 6,5; 2,6-ДМФ – 8	5-9	60	До 100% – при 40°С за 24 ч; >50% – при 60°С за 24 ч	АБТС: K _m – 0,40 мМ, k _{cat} – 9,99 с ⁻¹ ; 2,6-ДМФ: K _m – 4,27 мМ, k _{cat} – 4,20 с ⁻¹
LMCO (<i>S. pristinaespiralis</i>) (Reiss <i>et al.</i> , 2013) (Ihssen <i>et al.</i> , 2015)	32,6	АБТС – 4,7; 2,6-ДМФ – 7,6	н/о	н/о	60% – при 70°С за 30 мин	н/о
SslI (<i>S. sviveus</i>) (Gunne and Urlacher, 2012)	33 / 98,3	АБТС – 4; 2,6-ДМФ – 9; гваякол – 9; сирингальдазин – 8	11	н/о	50% – при 70°С за 29 мин; 50% – при 80°С за 10 мин	АБТС: K _m – 0,36 мМ, k _{cat} – 7,38 с ⁻¹ 2,6-ДМФ: K _m – 0,89 мМ; k _{cat} – 0,32 с ⁻¹

н/и – не исследовано.

4. 4. Кристаллизация 2д лакказ

Кристаллы лакказ, пригодные для рентгеноструктурного анализа, были получены для 2д лакказы из штамма *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, клонированного с сигнальным пептидом. Однако наличие сигнального пептида у 2д лакказ из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 препятствовало формированию крупных кристаллов. Это можно было объяснить нестабильной структурой 2д лакказ с сигнальным пептидом. Поэтому лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 были клонированы и экспрессированы без последовательности сигнального пептида (ПЦР-амплификация генов проводилась с использованием праймеров из таблицы 12). Структурный анализ белков идентифицирует последние как 2д лакказы, несущие 12 атомов меди на молекулу тримера и состоящие из шести купредоксиновых доменов в структуре тримера. Т2/Т3-медный кластер локализован между вторым доменом одного мономера, несущего Т1-медный центр, и первым доменом другого мономера, не несущего Т1-медный центр.

Анализ структуры субстратного канала лакказы бактерии *S. viridochromogenes* Ac-629 в сравнении с субстратным каналом лакказы гриба *Trametes versicolor* указывает на значительные различия в их строении (рис. 41). В нашей работе впервые обнаружено, что у 2д лакказы субстратный канал заметно уже, чем у 3д лакказ грибов. К тому же, аминокислоты, формирующие стенки канала у 3д лакказ грибов на примере фермента *T. versicolor*, представлены неполярными остатками (лейцин 459, пролин 346, фенилаланин), а у 2д лакказы бактерии Ac-629 полярными (треонин 163, глутамин 288). В частности, две аминокислоты, расположенные у входа в канал – аспартат 194 и глутамат 225, в щелочной среде вероятно приобретают отрицательный заряд, и препятствуют проникновению азид- и фторид- ионов к Т2/Т3 кластеру. И у 3д, и у 2д лакказы микроокружение Т2/Т3-кластера составляют восемь гистидинов. У 2д лакказы – His 99, 110, 153, 155, 231, 233, 284, 286, у 3д лакказы – His 64, 66, 109, 111, 398, 400, 452, 454. Помимо восьми остатков гистидина, 2д лакказа имеет три дополнительных остатка гистидина (151, 161 и 223) из микроокружения Т2/Т3-кластера, которые, вероятно, также депротонируются, внося вклад в формирование отрицательного заряда субстратного канала при щелочных значениях рН. Именно эти различия могли быть причиной отсутствия ингибирующего эффекта азид-иона натрия на активность 2д лакказ в щелочных условиях.

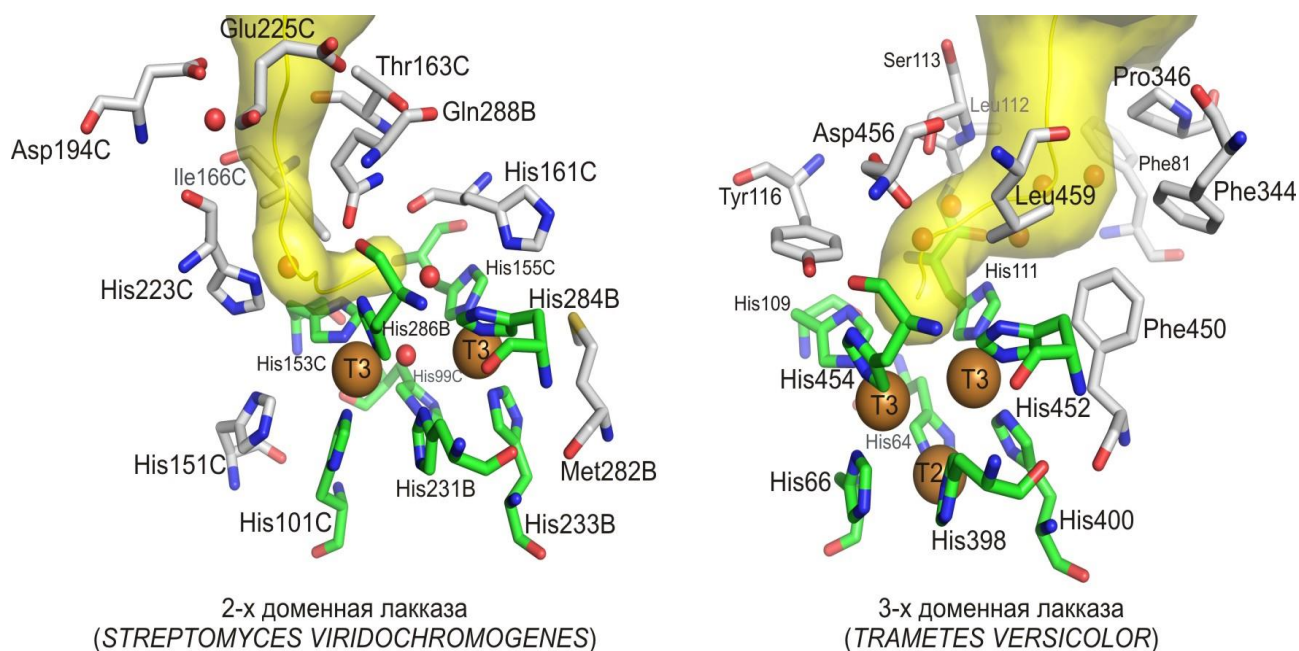


Рисунок 41. Структура T2/T3 металлоцентров и субстратных каналов двухдоменной лакказы *S. viridochromogenes* Ac-629 (A) (PDB ID: 4n8u) и трёхдоменной лакказы гриба *Trametes versicolor* (PDB ID:1kya) (B). Траектория каналов выделена жёлтым цветом, медь-связывающие гистидины выделены зелёным цветом, ионы меди – коричневые сферы.

В нашей работе было установлено, что 2д лакказы слабо ингибируются азидом натрия при кислых значениях pH, а при щелочных ингибирующий эффект может отсутствовать. Для объяснения данного эффекта 2д лакказа из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 была закристаллизована с азидом натрия в щелочных условиях (pH 9,0). Известно, что азид натрия связывается с T2/T3-центром 3д лакказы, препятствуя передаче электронов и, таким образом, ингибируя активность фермента. Поэтому даже при низкой концентрации азид натрия (1 мМ) наблюдается отсутствие ферментативной активности 3д лакказ. Анализ кристаллов 2д лакказы с азидом натрия показал, что азид не связывается с T2/T3-центром, а локализован на расстоянии 5,5 Å от T1-центра лакказы (рис. 36). Причина такой необычной локализации азид не установлена, однако невозможность связывания ингибитора с T2/T3-центром фермента в щелочных условиях, как мы предполагаем, связана с характером аминокислот субстратного канала 2д лакказ.

4. 5. Обесцвечивание трифенилметановых красителей 2д лакказами

Характеристики 2д лакказ, а именно их высокая термостабильность, способность окислять фенольные соединения при нейтральных значениях pH, устойчивость к азиду, фториду, высоким концентрациям солей, делают эти ферменты привлекательными для использования в биотехнологических целях. Однако 2д лакказы – низкопотенциальные ферменты. Для решения этой проблемы можно использовать редокс-медиаторы, повышающие окислительную способность пары лакказа/медиатор. Например, для 2д лакказ была показана способность фермента SilA обесцвечивать краситель Orange II в присутствии медиатора ацетосирингона, а также лакказы SLAC обесцвечивать краситель Indigo Carmine в присутствии альдегида сиреневой кислоты (Dube *et al.*, 2008; Molina-Guijarro *et al.*, 2009).

В данной работе была продемонстрирована способность окисления 2д лакказами трифенилметановых красителей: бриллиантового зелёного, малахитового зелёного и фуксина. Ферменты без медиатора были неспособны окислять эти красители. А в присутствии медиатора АБТС 2д лакказы эффективно обесцвечивали данные красители. Также в качестве медиаторов были проверены альдегид сиреневой кислоты, 3-гидроксиантраниловая кислота и 1-гидроксибензотриазол. Однако в отношении окисления азиновых красителей (метиленовый синий и нейтральный красный) данные медиаторы были неэффективны (данные не представлены). Известно, что АБТС является известным медиатором грибных лакказ. Для 3д бактериальных лакказ было продемонстрировано использование АБТС в качестве медиатора при окислении трифенилметановых красителей (Zhang *et al.*, 2012). Ранее возможность использования АБТС в качестве медиатора для 2д лакказ не была изучена. Известно, что ОВП красителей, обесцвечиваемых в данной работе, составляет 0,68 В. ОВП 2д лакказ имеет значение от 0,375 до 0,5 В (Machczynski *et al.*, 2004; Gallaway *et al.*, 2008; Gunne *et al.*, 2014). Таким образом, в проведенных экспериментах мы показали возможность увеличения ОВП пары лакказа/медиатор до 0,7 В.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из трёх штаммов стрептомицетов нами были клонированы и экспрессированы три гена двухдоменных лакказ. Две новые 2д лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993, а также ранее известный белок SLAC из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, были экспрессированы в гетерологичной системе (в штамме *E. coli*) и очищены до гомогенного состояния. Показано, что охарактеризованные 2д лакказы, имели два структурно-функциональных домена, были активны в форме тримеров, и не проявляли активность в форме мономеров. С эволюционной точки зрения 2д лакказы рассматриваются как предшественники 3д лакказ, которые имеют свойства, как характерные, так и необычные для 3д лакказ.

В ходе нашей работы была проведена физико-химическая характеристика 2д лакказ. Установлено, что в отличие от 3д лакказ, 2д бактериальные лакказы были более стабильны при щелочных значениях pH (9-11), имели оптимум окисления нефенольных субстратов при кислых значениях pH (4,0-4,5), а фенольных субстратов при щелочных значениях pH (8,5-9,2), были более стабильны к температурной денатурации. 2д Лакказы более эффективно окисляли нефенольные соединения. В данной работе охарактеризована самая термостабильная 2д лакказа (из *S. viridochromogenes* Ac-629) из описанных ранее. Фермент сохранял около 40% начальной активности после кипячения в течение часа. Исследовано влияние ингибиторов и ионов металлов на активность лакказ. Установлено, что 2д лакказы не ингибировались азидом и фторидом натрия в щелочных условиях.

Новые 2д лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 были закристаллизованы без сигнального пептида. Белки представляли собой гомотримеры, несущие 4 атома меди на 1 молекулу белка. Каждый мономер построен из восьми бета-структур. Анализ структуры субстратных каналов 2д лакказ из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629 впервые показал, что он заметно уже, чем у 3д грибов, что имеет принципиальное значение для понимания каталитических особенностей 2д лакказ. Кроме того, нами было предложено объяснение устойчивости 2д лакказ бактерий к типичным ингибиторам 3д лакказ грибов. Так, аминокислоты, формирующие стенки субстратного канала у 3д лакказ, обычно представлены неполярными остатками (лейцин, пролин, фенилаланин), а у 2д лакказ полярными (треонин, глутамин). В щелочной среде полярные остатки, по-видимому, приобретают отрицательный заряд и препятствуют проникновению азид- и фторид- ионов к T2/T3-центром фермента. Этим можно объяснить отсутствие связывания азидата натрия с T2/T3-центром, его необычную локализацию в

микроокружении T1-центра, и, как следствие, отсутствие ингибирующего эффекта азидата натрия на активность 2д лакказ в щелочных условиях.

Впервые была продемонстрирована способность 2д лакказ обесцвечивать трифенилметановые красители в паре с медиатором – АБТС, что указывает на возможность повышения ОВП пары 2д лакказа/медиатор до 0,7 В при использовании подходящего медиатора.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 2,6-ДМФ – 2,6-диметоксифенол
CuNIR – нитритредуктаза
 K_m – константа Михаэлиса
 k_{cat} – число оборотов фермента
PPO – *para*-фенилендиамин оксидаза
X-Gal – 5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозид
 ϵ – молярный коэффициент светопоглощения
a.o. – аминокислотный остаток
АБТС – 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин сульфоновая кислота)
АО – аскорбатоксидаза
ГМБ – голубые медьсодержащие белки
ДДС-Na – додецилсульфат натрия
ДМП – N,N-диметил-*para*-фенилендиаминсульфат
ИПТГ – изопропилтиогалактозид
КД – купредоксиновый домен
ММ – молекулярная масса
ОВП – окислительно-восстановительный потенциал
ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле
ПЭГ – полиэтиленгликоль
СГЗ – синрингальдазин (4-гидрокси-3,5-диметоксибензальдегид азин)
ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин
Трис – трис(гидроксиметил)аминометана
УФ – ультрафиолет
ЦП – церулоплазмин
ЦТАБ – бромистый цетилтриметиламмоний
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭДТА-Na – этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ВЫВОДЫ

1. Для работы выбраны 5 штаммов стрептомицетов, из которых клонированы два ранее неизвестных гена новых бактериальных 2д лакказ *Streptomyces viridochromogenes* Ас-629 и *Streptomyces griseoflavus* Ас-993 (нуклеотидные последовательности зарегистрированы в базе данных NCBI под номерами JX393082.1 и KP941125), а также ранее известный ген SLAC (EFD65350.1) *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ас-1709 с сигнальным пептидом.

2. 2д Лакказы *S. viridochromogenes* Ас-629, *S. griseoflavus* Ас-993 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ас-1709 были экспрессированы в *E. coli* М15 (pRep4) и получены в электрофоретически гомогенном состоянии.

3. Исследованы физико-химические характеристики ферментов (рН-оптимум и рН-стабильность, температурный оптимум и термостабильность, получен спектр поглощения ферментов с максимумами при 590 нм и плечами при 330 нм, исследовано влияние ингибиторов и ионов металлов на активность), определены кинетические параметры (K_m , K_{cat}) в отношении субстратов 2,2'-азинобис (3-этилбензотиазолин сульфоновой кислоты), 2,6-диметоксифенола и ферроцианида калия.

4. Подобраны условия и получены кристаллы термостабильных лакказ из штаммов *S. viridochromogenes* Ас-629, *S. griseoflavus* Ас-993 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ас-1709, пригодные для проведения рентгеноструктурного анализа.

5. С помощью рентгеноструктурного анализа доказано, что, в отличие от классических 3д лакказ, у 2д лакказ ширина субстратного канала существенно уже; аминокислоты, формирующие стенки субстратного канала, представлены полярными аминокислотами (треонин, глутамин); помимо восьми гистидинов, составляющих координационную сферу Т2/Т3-кластера, имеются три дополнительных остатка гистидина.

6. Впервые обнаружено, что азид натрия в щелочных условиях не связывался с Т2/Т3-центром лакказы из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ас-1709, а был локализован в микроокружении Т1-центра.

7. На примере реакций окисления трифенилметановых красителей 2д лакказами установлено, что использование эффективного медиатора позволяет повысить ОВП пары фермент/медиатор до 0,7 В.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Башилова Т.Г., Афанасьева В.А., Головлева Л.А., Леонтьевский А.А., Мясоедова Н.М.** Патент РФ №2148111 «Способ подготовки льняного волокна к мокрому прядению». – 2000.
2. **Глухов И.Л., Леонтьевский А.А.** Патент РФ №2421719 «Способ определения суммарной антиокислительной активности растительного масла». – 2010.
3. **Глухов И.Л., Шматченко В.В., Леонтьевский А.А.** Патент РФ №2418072 «Фотометрический способ определения концентрации общего билирубина в сыворотке крови с помощью бактериальной оксидазы из *Bacillus pumilis*». – 2011.
4. **Лисов А.В., Лисова З.А., Винокурова Н.Г., Леонтьевский А.А., Врублевская В.В., Моренков О.С.** Патент РФ №2494119 «Способ получения нового полимерного соединения, обладающего противовирусной активностью, сополимеризацией 2,5-дигидроксibenзойной кислоты и желатина с помощью фермента лакказы». – 2013.
5. **Морозова О.В., Шумакович Г.П., Горбачева М.А., Шлеев С.В., Ярополов А.И.** «Голубые» лакказы // Биохимия. – 2007. – Т. 72. – №10. – С. 1396-1412.
6. **Смирнов С.А., Королева О.В., Гаврилова В.П., Белова А.Б., Клячко Н.Л.** Лакказы из базидиомицетов: физико-химические характеристики и субстратная специфичность по отношению к метоксифенольным соединениям // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – №7. – С. 774-779.
7. **Плакунов В.К.** Основы энзимологии // Москва, Логос. – 2001. – 128с.
8. **Юревич Л.И., Лисов А.В., Леонтьевский А.А.** Двухдоменная лакказа бактерии *Streptomyces lividans* Ac-1709 – термостабильный биокатализатор, активный при щелочных значениях pH // Научно-технический вестник Поволжья. – 2012. – №5. – С. 64-68.
9. **Юревич Л.И., Лисов А.В., Леонтьевский А.А.** Патент РФ №2539780 «Рекомбинантная двухдоменная лакказа бактерии *Streptomyces griseoflavus* Ac-993, обладающая высокой термостабильностью и щелочным оптимумом pH окисления фенольных соединений; фрагмент ДНК, кодирующий двухдоменную лакказу бактерии *Streptomyces griseoflavus* Ac-993; способ получения двухдоменной лакказы бактерии *Streptomyces griseoflavus* Ac-993». – 2015.
10. **Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K.H., Cavaco-Paulo A., Gübitz G.M.** Decolourization and detoxification of textile dyes with laccase from *Trametes hirsute* // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – V. 66. – №8. – P. 3357-3362.

11. **Adman E.T., Murphy M.E.P.** Copper nitrite reductase. In: Handbook of Metalloproteins. – 2001. – V. 2. – P. 1381-1390, Messerschmidt A., Huber R., Poulos T. and Wieghardt K. (eds), Wiley, Ltd, New York.
12. **Agematu H., Tsuchida T., Kominato K., Shibamoto N., Yoshioka T., Nishida H., Okamoto R., Shin T., Murao S.** Enzymatic dimerization of penicillin X // The Journal of Antibiotics (Tokyo). – 1993. – V. 46. – №1. – P. 141-148.
13. **Ahn M.Y., Dec J., Kim J.E., Bollag J.M.** Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase // Journal of Environmental Quality. – 2002. – V. 31. – №5. – P. 1509-1515.
14. **An H., Xiao T., Fanb H., Wei D.** Molecular characterization of a novel thermostable laccase PPLCC2 from the brown rot fungus *Postia placenta* MAD-698-R // Electronic Journal of Biotechnology. – 2015. – V. 18. – №6. – P. 451-458.
15. **Alexandre G., Zhulin I.B.** Laccases are widespread in bacteria // Trends in Biotechnology. – 2000. – V. 18. – №2. – P. 41-42.
16. **Alves A.M., Record E., Lomascolo A., Scholtmeijer K., Asther M., Wessels J.G., Wosten H.A.** Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – V. 70. – №11. – P. 6379-6384.
17. **Arias M.E., Arenas M., Rodriguez J., Soliveri J., Ball A.S., Hernandez M.** Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – V. 69. – №4. – P. 1953-1958.
18. **Asada N., Namba M., Kodama T., Kyogoku Y.** Circular dichroism of prophenol oxidase in relation to the structural stability in *Drosophila melanogaster* // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2004. – V. 56. – №1. – P. 1-6.
19. **Ausec L., Crnigoj M., Snajder M., Ulrih N.P., Mandic-Mulec I.** Characterization of a novel high-pH-tolerant laccase-like multicopper oxidase and its sequence diversity in *Thioalkalivibrio* sp. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2015. – V. 99. – №23. – P. 9987-9999.
20. **Ausec L., Zakrzewski M., Goesmann A., Schlüter A., Mandic-Mulec I.** Bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes // PLoS One. – 2011. – V. 6. – №10. – P. e25724.
21. **Baldrian P.** Fungal laccases - occurrence and properties // FEMS Microbiology Reviews. – 2006. – V. 30. – №2. – P. 215-242.

22. **Baldrian P.** Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2004. – V. 50. – №3. – P. 245-253.
23. **Banci L., Bertini I., Dal Pozzo L., Del Conte R., Tien M.** Monitoring the role of oxalate in manganese peroxidase // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37. – №25. – P. 9009-9015.
24. **Bao S., Teng Z., Ding S.** Heterologous expression and characterization of a novel laccase isoenzyme with dyes decolorization potential from *Coprinus comatus* // *Molecular Biology Reports*. – 2013. – V. 40. – №2. – P. 1927-1936.
25. **Bao W., O'malley D.M., Whetten R., Sederoff R.R.** A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem // *Science*. – 1993. – V. 260. – №5108. –P. 672–674.
26. **Bauer C.G., Kuhn A., Gajovic N., Skorobogatko O., Holt P.J., Bruce N.C., Makower A., Lowe C.R., Scheller F.W.** New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase // *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. – 1999. – V. 364. – №1. – P. 179-183.
27. **Beaumont H.J., Hommes N.G., Sayavedra-Soto L.A., Arp D.J., Arciero D.M., Hooper A.B., Westerhoff H.V., van Spanning R.J.M.** Nitrite reductase of *Nitrosomonas europaea* is not essential for production of gaseous nitrogen oxides and confers tolerance to nitrite // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – V. 184. – №9. – P. 2557-2560.
28. **Beloqui A., Pita M., Polaina J., Martinez-Arias A., Golyshina O.V., Zumarraga M., Yakimov M.M., Garcia-Arellano H., Alcalde M., Fernandez V.M., Elborough K., Andreu J.M., Ballesteros A., Plou F.J., Timmis K.N., Ferrer M., Golyshin P.N.** Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281. – №32. – P. 22933-22942.
29. **Ben Younes S., Mechichi T., Sayadi S.** Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes // *Journal of Applied Microbiology*. – 2007. – V. 102. – №4. – P. 1033-1142.
30. **Bento I., Martins L.O., Lopes G.G., Carrondo M.A., Lindley P.F.** Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective // *Dalton Transactions*. – 2005. – №21. – P. 3507-3513.
31. **Berthet S., Demont-Caulet N., Pollet B., Bidzinski P., Cezard L., Le Bris P., Borrega N., Herve J., Blondet E., Balzergue S., Lapierre C., Jouanin L.** Disruption of laccase4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems // *Plant Cell*. – 2011. – V. 23. – №3. – P. 1124-1137.

32. **Blaich R., Esser K.** Function of enzymes in wood destroying fungi II. Multiple forms of laccase in white rot fungi // *Archives of Microbiology*. – 1975. – V. 103. – №1. – P. 271-277.
33. **Blanquez P., Casas N., Font X., Gabarrell X., Sarra M., Caminal G., Vicent T.** Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor* // *Water Research*. – 2004. – V. 38. – №8. – P. 2166-2172.
34. **Bohlin C., Jonsson L.J., Roth R., van Zyl W.H.** Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger* // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2006. – V. 129-132. – P. 195-214.
35. **Bourbonnais R., Leech D., Paice M.G.** Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1998. – V. 1379. – №3. – P. 381-390.
36. **Brander S., Mikkelsen J.D., Kepp K.P.** Characterization of an alkali- and halide-resistant laccase expressed in *E. coli*: CotA from *Bacillus clausii* // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – №6. – P. e99402.
37. **Britton H.T.K., Robinson R.A.** Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal // *Journal of the Chemical Society*. – 1931. – V. 10. – P. 1456-1462.
38. **Brown M.A., Zhao Z.W., Mauk A.G.** Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor* // *Inorganica Chimica Acta*. – 2002. – V. 331. – №1. – P. 232-238.
39. **Calabrese L., Carbonaro M., Musci G.** Presence of coupled trinuclear copper cluster in mammalian ceruloplasmin is essential for efficient electron transfer to oxygen // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – V. 264. – №11. – P. 6183-6187.
40. **Calvo A.M., Copa-Patino J.L., Alonso O., Gonzalez A.E.** Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents // *Archives of Microbiology*. – 1998. – V. 171. – №1. – P. 31-36.
41. **Camarero S., Ibarra D., Martinez M.J., Martinez A.T.** Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71. – №4. – P. 1775-1784.
42. **Canas A.I., Camarero S.** Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes // *Biotechnology Advances*. – 2010. – V. 28. – №6. – P. 694-705.

43. **Castro-Sowinski S., Martinez-Drets G., Okon Y.** Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti* // FEMS Microbiology Letters. – 2002. – V. 209. – №1. – P. 119-125.
44. **Chaurasia P.K., Yadav A., Yadav S.S., Yadava S.** Purification and characterization of laccase secreted by *Phellinus linteus* MTCC-1175 and its role in the selective oxidation of aromatic methyl group // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2013. – V. 49. – №6. – P. 592-599.
45. **Chen Q., Marshall M.N., Geib S.M., Tien M., Richard T.L.** Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover // Bioresource Technology. – 2012б. – V. 117. – P. 186-192.
46. **Chen S.C., Wu P.H., Su Y.C., Wen T.N., Wei Y.S., Wang N.C., Hsu C.A., Wang A.H., Shyur L.F.** Biochemical characterization of a novel laccase from the basidiomycete fungus *Cerrena* sp. WR1 // Protein Engineering Design and Selection. – 2012a. – V. 25. – №11. – P. 761-769.
47. **Cho E.A., Seo J., Lee D.W., Pan J.G.** Decolorization of indigo carmine by laccase displayed on *Bacillus subtilis* spores // Enzyme and Microbial Technology. – 2011. – V. 49. – №1. – P. 100-104.
48. **Claus H.** Laccases and their occurrence in prokaryotes // Archives of Microbiology. – 2003. – V. 179. – №3. – P. 145-150.
49. **Claus H.** Laccases: structure, reactions, distribution // Micron. – 2004. – V. 35. – №1-2. – P. 93-96.
50. **Claus H., Filip Z.** The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain // Microbiological Research. – 1997. – V. 152. – №2. – P. 209-216.
51. **Cole J.L., Ballou D.P., Solomon E.I.** Spectroscopic characterization of the peroxide intermediate in the reduction of dioxygen catalyzed by the multicopper oxidases // Journal of the American Chemical Society. – 1991. – V. 113. – №22. – P. 8544-8546.
52. **Cole J.L., Tan G.O., Yang E.K., Hodgson K.O., Solomon E.I.** Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen: an X-ray absorption edge study // Journal of the American Chemical Society. – 1990. – V. 112. – №6. – P. 2243-2249.
53. **Collins P.J., Dobson A.** Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor* // Applied and Environmental Microbiology. – 1997. – V. 63. – №9. – P. 3444-3450.
54. **Coman C., Mot A.C., Gal E., Parvu M., Silaghi-Dumitrescu R.** Laccase is upregulated via stress pathways in the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* // Fungal Biology. – 2013. – V. 117. – №7-8. – P. 528-539.

55. **Conrad L.S., Sponholz W.R., Berker O.** US patent №6152966 «Treatment of cork with a phenol oxidizing enzyme». – 2000.
56. **Corstjens P.L., de Vrind J.P., Westbroek P., de Vrind-de Jong E.W.** Enzymatic iron oxidation by *Leptothrix discophora*: identification of an iron-oxidizing protein // Applied and Environmental Microbiology. – 1992. – V. 58. – №2. – P. 450-454.
57. **Couto S.R., Herrera J.L.T.** Industrial and biotechnological applications of laccases. A review // Biotechnology Advances. – 2006. – V. 24. – №5. – P. 500-513.
58. **Couto S.R., Sanroman M.A.A.** Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production // Biochemical Engineering Journal. – 2005. – V. 22. – №3. – P. 211-219.
59. **Coy M.R., Salem T.Z., Denton J.S., Kovaleva E.S., Liu Z., Barber D.S., Campbell J.H., Davis D.C., Buchman G.W., Boucias D.G., Scharf M.E.** Phenol-oxidizing laccases from the termite gut // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2010. – V. 40. – №10. – P. 723-732.
60. **D'Annibale A., Celletti D., Felici M., Dimattia E., Giovannozzi-Sermanni G.** Substrate specificity of laccase from *Lentinus edodes* // Acta Biotechnologica. – 1996. – V. 16. – №4. – P. 257-270.
61. **Daassi D., Zouari-Mechichi H., Prieto A., Martinez M.J., Nasri M., Mechichi T.** Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes* sp. isolated in Tunisia: role of the enzyme in olive mill waste water treatment // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2013. – V. 29. – №11. – P. 2145-2155.
62. **Daroch M., Houghton C.A., Moore J.K., Wilkinson M.C., Carnell A.J., Bates A.D., Iwanejko L.A.** Glycosylated yellow laccases of the basidiomycete *Stropharia aeruginosa* // Enzyme and Microbial Technology. – 2014. – V. 58-59. – P. 1-7.
63. **Das N., Sengupta S., Mukherjee M.** Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida* // Applied and Environmental Microbiology. – 1997. – V. 63. – №10. – P. 4120-4122.
64. **De Souza C.G., Tychanowicz G.K., de Souza D.F., Peralta R.M.** Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds // Journal of Basic Microbiology. – 2004. – V. 44. – №2. – P. 129-136.
65. **De Souza C.G.M., Peralta R.M.** Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium // Journal of Basic Microbiology. – 2003. – V. 43. – №4. – P. 278-286.
66. **Di Fusco M., Tortolini C., Deriu D., Mazzei F.** Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine // Talanta. – 2010. – V. 81. – №1-2. – P. 235-240.

67. **Diamantidis G., Effosse A., Potier P., Bally R.** Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum* // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2000. – V. 32. – №7. – P. 919-927.
68. **DiSpirito A.A., Taaffe L.R., Lipscomb J.D., Hooper A.B.** A 'blue' copper oxidase from *Nitrosomonas europaea* // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1985. – V. 827. – №3. – P. 320-326.
69. **Dittmer N.T., Gorman M.J., Kanost M.R.** Characterization of endogenous and recombinant forms of laccase-2, a multicopper oxidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2009. – V. 39. – №9. – P. 596-606.
70. **Dominguez A., Couto S.R., Sanroman M.A.** Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads // *World Journal of Microbiology and Biotechnology* – 2005. – V. 21. – №4. – P. 405-409.
71. **Dong A., Fan X., Wang Q., Yu Y., Cavaco-Paulo A.** Hydrophobic surface functionalization of lignocellulosic jute fabrics by enzymatic grafting of octadecylamine // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2015. – V. 79. – P. 353-362.
72. **Dube E., Shareck F., Hurtubise Y., Daneault C., Beaugregard M.** Homologous cloning, expression, and characterization of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – V. 79. – №4. – P. 597-603.
73. **Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Brown S.H., Ostergaard P., Schneider P., Yaver D.S., Pedersen A.H., Davies G.J.** Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 1998. – V. 5. – №4. – P. 310-316.
74. **Duran N., Esposito E.** Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2000. – V. 28. – №2. – P. 83-99.
75. **Durao P., Bento I., Fernandes A.T., Melo E.P., Lindley P.F., Martins L.O.** Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. – 2006. – V. 11. – №4. – P. 514-526.
76. **Durao P., Chen Z., Fernandes A.T., Hildebrandt P., Murgida D.H., Todorovic S., Pereira M.M., Melo E.P., Martins L.O.** Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. – 2008. – V. 13. – №2. – P. 183-193.

77. **Edens W.A., Goins T.Q., Dooley D., Henson J.M.** Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – V. 65. – №7. – P. 3071-3074.
78. **Eggert C., Temp U., Dean J.F.D., Eriksson K.-E.L.** A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase // FEBS Letters. – 1996. – V. 391. – №1-2. – P. 144-148.
79. **Endo K., Hayashi Y., Hibi T., Hosono K., Beppu T., Ueda K.** Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus* // Journal of Biochemistry. – 2003. – V. 133. – №5. – P. 671-677.
80. **Endo K., Hosono K., Beppu T., Ueda K.** A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis // Microbiology. – 2002. – V. 148. – Pt 6. – P. 1767-1776.
81. **Enguita F.J., Martins L.O., Henriques A.O., Carrondo M.A.** Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties // The Journal of Biological Chemistry. – 2003. – V. 278. – №21. – P. 19416-19425.
82. **Fairbanks J., Steek T.K., Wallach D.F.** Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. – 1971. – V. 10. – №13. – P. 2606-2617.
83. **Fang Z., Li T., Wang Q., Zhang X., Peng H., Fang W., Hong Y., Ge H., Xiao Y.** A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – V. 89. – №4. – P. 1103-1110.
84. **Fang Z., Zhou P., Chang F., Yin Q., Fang W., Yuan J., Zhang X., Xiao Y.** Structure-based rational design to enhance the solubility and thermostability of a bacterial laccase Lac15 // PLoS One. – 2014. – V. 9. – №7. – P. e102423.
85. **Fang Z.M., Li T.L., Chang F., Zhou P., Fang W., Hong Y.Z., Zhang X.C., Peng H., Xiao Y.Z.** A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability // Bioresource Technology. – 2012. – V. 111. – P. 36-41.
86. **Farnet A.M., Criquet S., Tagger S., Gil G., Le Petit J.** Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17 // Canadian Journal of Microbiology. – 2000. – V. 46. – №3. – P. 189-194.
87. **Feng H., Zhang D., Sun Y., Zhi Y., Mao L., Luo Y., Xu L., Wang L., Zhou P.** Expression and characterization of a recombinant laccase with alkalistable and thermostable

- properties from *Streptomyces griseorubens* JSD-1 // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2015. – V. 176. – №2. – P. 547-562.
88. **Fernandes A.T., Damas J.M., Todorovic S., Huber R., Baratto M.C., Pogni R., Soares C.M., Martins L.O.** The multicopper oxidase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum* shows nitrous oxide reductase activity // FEBS Journal. – 2010. – V. 277. – №15. – P. 3176-3189.
89. **Fernandes A.T., Soares C.M., Pereira M.M., Huber R., Grass G., Martins L.O.** A robust metallo-oxidase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* // FEBS Journal. – 2007. – V. 274. – №11. – P. 2683-2694.
90. **Ferraroni M., Matera I., Chernykh A., Kolomytseva M., Golovleva L.A., Scozzafava A., Briganti F.** *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2012. – V. 111. – P. 203-209.
91. **Ferraroni M., Myasoedova N.M., Schmatchenko V., Leontievsky A.A., Golovleva L.A., Scozzafava A., Briganti F.** Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases // BMC Structural Biology. – 2007. – V. 7. – P. 60-72.
92. **Ferry Y., Leech D.** Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode // Electroanalysis. – 2005. – V. 17. – №2. – P. 113-119.
93. **Fokina O., Eipper J., Kerzenmacher S., Fischer R.** Selective natural induction of laccases in *Pleurotus sajor-caju*, suitable for application at a biofuel cell cathode at neutral pH // Bioresource Technology. – 2016. – V. 218. – P. 455-462.
94. **Forootanfar H., Faramarzi M.A., Shahverdi A.R., Yazdi M.T.** Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile* // Bioresource Technology. – 2011. – V. 102. – №2. – P. 1808-1814.
95. **Froehner S.C., Eriksson K.E.L.** Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase // Journal of Bacteriology. – 1974. – V. 120. – №1. – P. 458-465.
96. **Fukushima Y., Kirk T.K.** Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system // Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – V. 61. – №3. – P. 872-876.
97. **Galai S., Limam F., Marzouki M.N.** New *Stenotrophomonas maltophilia* strain producing laccase. Use in decolorization of synthetic dyes // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2008. – V. 158. – №2. – P. 416-431.

98. **Gallaway J., Wheeldon I., Rincon R., Atanassov P., Banta S., Barton S.C.** Oxygen-reducing enzyme cathodes produced from SLAC, a small laccase from *Streptomyces coelicolor* // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2008. – V. 23. – №8. – P. 1229-1235.
99. **Garcia T.A., Santiago M.F., Ulhoa C.J.** Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – V. 75. – №2. – P. 311-318.
100. **Gassara-Chatti F., Brar S. K., Ajila C.M., Verma M., Tyagi R.D., Valero J.R.** Encapsulation of ligninolytic enzymes and its application in clarification of juice // *Food Chemistry*. – 2013. – V. 137. – №1-4. – P. 18-24.
101. **Gianfreda L., Xu F., Bollag J.-M.** Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes // *Bioremediation Journal*. – 1999. – V. 3. – №1. – P. 1-25.
102. **Giardina P., Autore F., Faraco V., Festa G., Palmieri G., Piscitelli A., Sannia G.** Structural characterization of heterodimeric laccases from *Pleurotus ostreatus* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – V. 75. – №6. – P. 1293-1300.
103. **Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G., Sannia G.** Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus* // *Biochemical Journal*. – 1999. – V. 341. – Pt 3. – P. 655–663.
104. **Gigi O., Marbach I., Mayer A.M.** Properties of gallic acid induced extracellular laccase of *Botrytis cinerea* // *Phytochemistry*. – 1981. – V. 20. – P. 1211-1213.
105. **Givaudan A., Effosse A., Faure D., Potier P., Bouillant M.L., Bally R.** Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum* // *FEMS Microbiology Letters*. – 1993. – V. 108. – №2. – P. 205-210.
106. **Gorman M.J., Sullivan L.I., Nguyen T.D., Dai H., Arakane Y., Dittmer N.T., Syed L.U., Li J., Hua D.H., Kanost M.R.** Kinetic properties of alternatively spliced isoforms of laccase-2 from *Tribolium castaneum* and *Anopheles gambiae* // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2012. – V. 42. – №3. – P. 193-202.
107. **Grass G., Rensing C.** CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2001. – V. 286. – №5. – P. 902-908.
108. **Greimel K.J., Perz V., Koren K., Feola R., Temel A., Sohar C., E.H. Acero, Klimantc I., Guebitza G.M.** Banning toxic heavy-metal catalysts from paints: enzymatic cross-linking of alkyd resins // *Green Chemistry*. – 2013. – V. 15. – P. 381-388.

109. **Gualco L.M.P., Johnston J.P.** US Patent №6815410 «Pouched cleaning compositions». – 2004.
110. **Guan Z.B., Zhang N., Song C.M., Zhou W., Zhou L.X., Zhao H., Xu C.W., Cai Y.J., Liao X.R.** Molecular cloning, characterization, and dye-decolorizing ability of a temperature and pH-stable laccase from *Bacillus subtilis* X1 // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2014. – V. 172. – №3. – P. 1147-1157.
111. **Gunne M., Hoppner A., Hagedoorn P.L., Urlacher V.B.** Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* // FEBS Journal. – 2014. – V. 281. – №18. – P. 4307-4318.
112. **Gunne M., Urlacher V.B.** Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* with unusual properties discovered by genome mining // PLoS One. – 2012. – V. 7. – №12. – P. e52360.
113. **Gutierrez A., Rencoret J., Ibarra D., Molina S., Camarero S., Romero J., Del Rio J.C., Martinez A.T.** Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators // Environmental Science and Technology. – 2007. – V. 41. – №11. – P. 4124-4129.
114. **Hassani T., Ba S., Cabana H.** Formation of enzyme polymer engineered structure for laccase and cross-linked laccase aggregates stabilization // Bioresource Technology. – 2013. – V. 128. – P. 640-645.
115. **Hattori M., Tsuchihara K., Noda H., Konishi H., Tamura Y., Shinoda T., Nakamura M., Hasegawa T.** Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae) // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2010. – V. 40. – №4. – P. 331-338.
116. **Heinfling A., Martinez A.T., Martinez M.J., Bergbauer M., Szewczyk U.** Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta* // FEMS Microbiology Letters. – 1998. – V. 165. – №1. – P. 43-50.
117. **Heinzkill M., Bech L., Halkier T., Schneider P., Anke T.** Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*) // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1998. – V. 64. – №5. – P. 1601-1606.
118. **Held C., Kandelbauer A., Schroeder M., Cavaco-Paulo A., Guebitz G.M.** Biotransformation of phenolics with laccase containing bacterial spores // Environmental Chemistry Letters. – 2005. – V. 3. – №2. – P. 74-77.
119. **Henson J.M., Butler M.J., Day A.W.** The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi // Annual Review of Phytopathology. – 1999. – V. 37. – P. 447-471.

120. **Herter S., Schmidt M., Thompson M.L., Mikolasch A., Schauer F.** A new phenol oxidase produced during melanogenesis and encystment stage in the nitrogen-fixing soil bacterium *Azotobacter chroococcum* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – V. 90. – №3. – P. 1037-1049.
121. **Hilden K., Makela M.R., Lundell T., Kuuskeri J., Chernykh A., Golovleva L., Archer D.B., Hatakka A.** Heterologous expression and structural characterization of two low pH laccases from a biopulping white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – V. 97. – №4. – P. 1589-1599.
122. **Hofer C., Schlosser D.** Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase // *FEBS Letters*. – 1999. – V. 451. – №2. – P. 186-190.
123. **Hoshida H., Fujita T., Murata K., Kubo K., Akada R.** Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2005. – V. 69. – №6. – P. 1090-1097.
124. **Hou H., Zhou J., Wang J., Du C., Yan B.** Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye // *Process Biochemistry*. – 2004. – V. 39. – №11. – P. 1415-1419.
125. **Hullo M.-F., Moszer I., Danchin A., Martin-Verstraete I.** CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – V. 183. №18. – P. 5426-5430.
126. **Ibarra-Escutia P., Juarez Gomez J., Calas-Blanchard C., Marty J.L., Ramirez-Silva M.T.** Amperometric biosensor based on a high resolution photopolymer deposited onto a screen-printed electrode for phenolic compounds monitoring in tea infusions // *Talanta*. – 2010. – V. 81. – №4-5. – P. 1636-1642.
127. **Ihsen J., Reiss R., Luchsinger R., Thöny-Meyer L., Richter M.** Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli* // *Scientific Reports*. – 2015. – V. 5. – P. 10465.
128. **Ishigami T., Hirose Y., Yamada Y.** Characterization of polyphenol oxidase from *Chaetomium thermophile*, a thermophilic fungus // *The Journal of General and Applied Microbiology*. – 1988. – V. 34. – P. 401-407.
129. **Jarosz-Wilkolazka A., Ruzgas T., Gorton L.** Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2004. – V. 35. – №2-3. – P. 238-241.
130. **Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M.** Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants,

- antifungal activity, and metabolism // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2002. – V. 50. – №10. – P. 2731-2741.
131. **Johannes C., Majcherczyk A.** Laccase activity tests and laccase inhibitors // Journal of Biotechnology. – 2000. – V. 78. – №2. – P. 193-199.
132. **Jovanovic S.V., Tosic M., Simic M.G.** Use of the Hammett correlation and σ^+ for calculation of one-electron redox potentials of antioxidants // The Journal of Physical Chemistry. – 1991. – V. 95. – №26. – P. 10824-10827.
133. **Kaira G.S., Dhakar K., Pandey A.** A psychrotolerant strain of *Serratia marcescens* (MTCC 4822) produces laccase at wide temperature and pH range // AMB Express. – 2015. – V. 5. – №1. – P. 92.
134. **Kajita S., Sugawara S., Miyazaki Y., Nakamura M., Katayama Y., Shishido K., Iimura Y.** Overproduction of recombinant laccase using a homologous expression system in *Coriolus versicolor* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2004. – V. 66. – №2. – P. 194-199.
135. **Kalme S., Jadhav S., Jadhav M., Govindwar S.** Textile dye degrading laccase from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 // Enzyme and Microbial Technology. – 2009. – V. 44. – №2. – P. 65-71.
136. **Kanbi L.D., Antonyuk S., Hough M.A., Hall J.F., Dodd F.E., Hasnain S.S.** Crystal structures of the Met148Leu and Ser86Asp mutants of rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: insights into the structural relationship with the cupredoxins and the multi copper proteins // Journal of Molecular Biology. – 2002. – V. 320. – №2. – P. 263-275.
137. **Keum Y.S., Li Q.X.** Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls // Chemosphere. – 2004. – V. 56. – №1. – P. 23-30.
138. **Kilaru S., Hoegger P.J., Kues U.** The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies // Current Genetics. – 2006. – V. 50. – №1. – P. 45-60.
139. **Kim H.W., Lee S.Y., Park H., Jeon S.J.** Expression, refolding, and characterization of a small laccase from *Thermus thermophilus* HJ6 // Protein Expression and Purification. – 2015. – V. 114. – P. 37-43.
140. **Kim S., Moldes D., Cavaco-Paulo A.** Laccases for enzymatic colouration of unbleached cotton // Enzyme and Microbial Technology. – 2007. – V. 40. – №7. – P. 1788-1793.
141. **Ko E.M., Leem Y.E., Choi H.T.** Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2001. – V. 57 – №1-2. – P. 98-102.

142. **Koschorreck K., Richter S.M., Ene A.B., Roduner E., Schmid R.D., Urlacher V.B.** Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – V. 79. – №2. – P. 217-224.
143. **Koschorreck K., Schmid R.D., Urlacher V.B.** Improving the functional expression of a *Bacillus licheniformis* laccase by random and site-directed mutagenesis // *BMC Biotechnology*. – 2009. – V. 9. – P. 12.
144. **Kudanga T., Le Roes-Hill M.** Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – V. 98. – №15. – P. 6525-6542.
145. **Kumar G.N., Srikumar K.** Characterization of xerophytic thermophilic laccase exhibiting metal ion-dependent dye decolorization potential // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2012. – V. 167. – №3. – P. 662-676.
146. **Kumar G.N., Srikumar K.** Thermophilic laccase from xerophyte species *Opuntia vulgaris* // *Biomedical Chromatography*. – 2011. – V. 25. – №6. – P. 707-711.
147. **Kumari H.L., Sirsi M.** Purification and properties of laccase from *Ganoderma lucidum* // *Archives of Microbiology*. – 1972. – V. 84. – №4. – P. 350-357.
148. **Kunamneni A., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M.** Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications // In: Mendez-Vilas A, editor. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. – 2007. – V. 1. – P. 233-245.
149. **Kunamneni A., Camarero S., García-Burgos C., Plou F.J., Ballesteros A., Alcalde M.** Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis // *Microbial Cell Factories*. – 2008a. – V. 7. – P. 32.
150. **Kunamneni A., Ghazi I., Camarero S., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M.** Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers // *Process Biochemistry*. – 2008b. – V. 43. – №2. – P. 169-178.
151. **Kuznetsov B.A., Shumakovich G.P., Koroleva O.V., Yaropolov A.I.** On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2001. – V. 16. – №1-2. – P. 73-84.
152. **La Croix L.B., Shadle S.E., Wang Y., Averill B.A., Hedman B., Hodgson K.O., Solomon E.I.** Electronic structure of the perturbed blue copper site in nitrite reductase:

spectroscopic properties, bonding, and implications for the entatic/rack state // *Journal of the American Chemical Society*. – 1996. – V. 118. – №33. – P. 7755-7768.

153. **Labat E., Morel M.H., Rouau X.** Effects of laccase and ferulic acid on wheat flour doughs // *Cereal Chemistry*. – 2000. – V. 77. – №6. – P. 823-828.

154. **Laemmly U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – P. 680-685.

155. **Lang M., Kanost M.R., Gorman M.J.** Multicopper oxidase-3 is a laccase associated with the peritrophic matrix of *Anopheles gambiae* // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – №3. – P. e33985.

156. **Larrabee J.A., Spiro T.G.** Cobalt II substitution in the type 1 site of the multi-copper oxidase *Rhus* laccase // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1979. – V. 88. – №3. – P. 753-760.

157. **Lawton T.J., Sayavedra-Soto L.A., Arp D.J., Rosenzweig A.C.** Crystal structure of a two-domain multicopper oxidase: implications for multicopper blue proteins // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – V. 284. – №15. – P. 10174-10180.

158. **Lee S.K., George S.D., Antholine W.E., Hedman B., Hodgson K.O., Solomon E.I.** Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase // *Journal of the American Chemical Society*. – 2002. – V. 124. – №21. – P. 6180-6193.

159. **Leite O.D., Lupetti K.O., Fatibello-Filho O., Vieira I.C., de Barbosa A.M.** Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines // *Talanta*. – 2003. – V. 59. . – №5. – P. 889-896.

160. **Leonowicz A., Cho N.S., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D, Rogalski J.** Fungal laccase: properties and activity on lignin // *Journal of Basic Microbiology*. – 2001. – V. 41. – №3-4. – P. 185-227.

161. **Leontievsky A., Myasoedova N., Pozdnyakova N., Golovleva L.** ‘Yellow’ laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators // *FEBS Letters*. – 1997. – V. 25. – №3. – P. 446-448.

162. **Leontievsky, A. A., Myasoedova N. M., Golovleva L.A.** Production of ligninolytic enzymes of the white rot fungus *Panus tigrinus* // *Journal of Biotechnology*. – 1994. – V. 32. – №3. – P. 299-307.

163. **Levasseur A., Saloheimo M., Navarro D., Andberg M., Pontarotti P., Kruus K., Record E.** Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma*

- reesei*: a functional, phylogenetic and evolutionary study // BMC Biochemistry. – 2010. – V. 11. – P. 32.
164. **Li Q., Wang X., Korzhev M., Schroder H.C., Link T., Tahir M.N., Diehl-Seifert B., Muller W.E.** Potential biological role of laccase from the sponge *Suberites domuncula* as an antibacterial defense component // Biochimica et Biophysica Acta. – 2015. – V. 1850. – №1. – P. 118-128.
165. **Li Y., Zuo W., Li Y., Wang X.** Cloning of multicopper oxidase gene from *Ochrobactrum* sp. 531 and characterization of its alkaline laccase activity towards phenolic substrates // Advances in Biological Chemistry. – 2012. – V. 2. – №3. – P. 248-255.
166. **Lisdat F., Wollenberger U., Makower A., Hortnagl H., Pfeiffer D., Scheller F.W.** Catecholamine detection using enzymatic amplification // Biosensors and Bioelectronics. – 1997. – V. 12. – №12. – P. 1199-1211.
167. **Lisov A., Leontievsky A., Golovleva A., Evans C.** Reaction of “hybrid” Mn-peroxidase of the white rot fungus *Panus tigrinus* with benzylic alcohols in the presence of mediators // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2004. – V. 31. – №1-3. – P. 1-8.
168. **Lisov A.V., Zavarzina A.G., Zavarzin A.A., Leontievsky A.A.** Laccases produced by lichens of the order *Peltigerales* // FEMS Microbiology Letters. – 2007. – V. 275. – №1. – P. 46-52.
169. **Lisova Z.A., Lisov A.V., Leontievsky A.A.** Two laccase isoforms of the basidiomycete *Cerrena unicolor* VKMF-3196. Induction, isolation and properties // Journal of Basic Microbiology. – 2010. – V. 50. – №1. – P. 72-82.
170. **Liu H., Cheng Y., Du B., Tong C., Liang S., Han S., Zheng S., Lin Y.** Overexpression of a novel thermostable and chloride-tolerant laccase from *Thermus thermophilus* SG0.5JP17-16 in *Pichia pastoris* and its application in synthetic dye decolorization // PLoS One. – 2015. – V. 10. – №3. – P. e0119833.
171. **Lu L., Wang T.N., Xu T.F., Wang J.Y., Wang C.L., Zhao M.** Cloning and expression of thermo-alkali-stable laccase of *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* and its characterization // Bioresource Technology. – 2013. – V. 134. – P. 81-86.
172. **Lu L., Zeng G., Fan C., Zhang J., Chen A., Chen M., Jiang M., Yuan Y., Wu H., Lai M., He Y.** Diversity of two-domain laccase-like multicopper oxidase genes in *Streptomyces* spp.: identification of genes potentially involved in extracellular activities and lignocellulose degradation during composting of agricultural waste // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – V. 80. – №11. – P. 3305-3314.

173. **Lu L., Zhao M., Wang T.N., Zhao L.Y., Du M.H., Li T.L., Li D.B.** Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04 // *Bioresource Technology*. – 2012. – V. 115. – P. 35-40.
174. **Lyashenko A.V., Zhukova Y.N., Zhukhlistova N.E., Zaitsev V.N., Stepanova E.V., Kachalova G.S., Koroleva O.V., Voelter W., Betzel C., Tishkov V.I., Bento I., Gabdulkhakov G., Morgunova E.Y., Lindley P.F., Mikhailov A.M.** Three-dimensional structure of laccase from *Coriolus zonatus* at 2.6 Å resolution // *Crystallography Reports*. – 2006. – V. 51. – №5. – P. 817-823.
175. **Machczynski M.C., Vijgenboom E., Samyn B., Canters G.W.** Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity // *Protein Science*. – 2004. – V. 13. – №9. – P. 2388-2397.
176. **Maier G., Dietrich H., Wucherpfenning K.** Winemaking without SO₂ – with the aid of enzymes? // *Weinwirtschaft-Technik*. – 1990. – V. 126. – P. 18-22.
177. **Malkin R., Malmstrom B.G.** The state and function of copper in biological systems // *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. – 1970. – V. 33. – P. 177-244.
178. **Malmstrom D.G.** Enzymology of oxygen // *Annual Review of Biochemistry*. – 1982. – V. 51. – P. 21-59.
179. **Marbach I., Harel E., Mayer A.M.** Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase // *Phytochemistry*. – 1984. – V. 23. – P. 2713-2717.
180. **Martinez-Espinosa R.M., Richardson D.J., Butt J.N., Bonete M.J.** Respiratory nitrate and nitrite pathway in the denitrifier haloarchaeon *Haloferax mediterranei* // *Biochemical Society Transactions*. – 2006. – V. 34. – №1. – P. 115-117.
181. **Martinez-Morales F, Bertrand B., Pasion Nava A.A., Tinoco R., Acosta-Urdapilleta L., Trejo-Hernandez M.R.** Production, purification and biochemical characterization of two laccase isoforms produced by *Trametes versicolor* grown on oak sawdust // *Biotechnology Letters*. – 2015. – V. 37. – №2. – P. 391-396.
182. **Martins L.O., Soares C.M., Pereira M.M., Teixeira M., Costa T., Jones G.H., Henriques A.O.** Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277. – №21. – P. 18849-18859.
183. **Masaphy S., Levanon D.** The effect of lignocellulose on lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1992. – V. 36. – №6. – P. 828-832.

184. **Mate D.M., Alcalde M.** Laccase engineering: from rational design to directed evolution // *Biotechnology Advances*. – 2014. – V. 33. – №1. – P. 25-40.
185. **Matera I., Gullotto A., Tilli S., Ferraroni M., Scozzafava A., Briganti F.** Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with *p*-toluate // *Inorganica Chimica Acta*. – 2008. – V. 361. – №14-15. – P. 4129-4137.
186. **Mathews S.L., Smithson C.E., Grunden A.M.** Purification and characterization of a recombinant laccase-like multi-copper oxidase from *Paenibacillus glucanolyticus* SLM1 // *Journal of Applied Microbiology*. – 2016. – V. 121. – №5. – P. 1335-1345.
187. **Mathiasen T.E.** Patent WO №9521240 A2 «Laccase and beer storage». – 1995.
188. **Mayer A.M., Staples R.C.** Laccase: new functions for an old enzyme // *Phytochemistry*. – 2002. – V. 60. – №6. – P. 551-565.
189. **Melo E.P., Fernandes A.T., Durao P., Martins L.O.** Insight into stability of CotA laccase from the spore coat of *Bacillus subtilis* // *Biochemical Society Transactions*. – 2007. – V. 35 – Pt. 6. – P. 1579-1582.
190. **Messerschmidt A., Huber R.** The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modeling and structural relationships // *European Journal of Biochemistry*. – 1990. – V. 187. – №2. – P. 341-352.
191. **Messerschmidt A., Ladenstein R., Huber R., Bolognesi M., Avigliano L., Petruzzelli R., Rossi A., Finazzi-Agro A.** Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution // *Journal of Molecular Biology*. – 1992. – V. 224. – №1. – P. 179-205.
192. **Messerschmidt A., Rossi A., Ladenstein R., Huber R., Bolognesi M., Gatti G., Marchesini A., Petruzzelli R., Finazzi-Agro A.** X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from zucchini. Analysis of the polypeptide fold and a model of the copper sites and ligands // *Journal of Molecular Biology*. – 1989. – V. 206. – №3. – P. 513-529.
193. **Mikolasch A., Hessel S., Salazar M.G., Neumann H., Manda K., Gordes D., Schmidt E., Thurow K., Hammer E., Lindequist U., Beller M., Schauer F.** Synthesis of new N-analogous corollosporine derivatives with antibacterial activity by laccase-catalyzed amination // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. – 2008. – V. 56. – №6. – P. 781-786.
194. **Min K.L., Kim Y.H., Kim Y.W., Jung H.S., Hah Y.C.** Characterization of a novel laccase produced by the woodrotting fungus *Phellinus ribis* // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2001. – V. 392. – №2. – P. 279-286.
195. **Minussi R.C., Pastore G.M., Duran N.** Potential applications of laccase in the food industry // *Trends in Food Science and Technology*. – 2002. – V. 13. – №6-7. – P. 205-216.

196. **Miyazaki K.** A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27 // *Extremophiles*. – 2005. – V. 9. – №6. – P. 415-425.
197. **Mogharabia M., Faramarzi M.A.** Laccase and laccase-mediated systems in the synthesis of organic compounds // *Advanced Synthesis and Catalysis*. – 2014. – V. 356. – №5. – P. 897-927.
198. **Mohammadian M., Fathi-Roudsari M., Mollania N., Badoei-Dalfard A., Khajeh K.** Enhanced expression of a recombinant bacterial laccase at low temperature and microaerobic conditions: purification and biochemical characterization // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – V. 37. – №8. – P. 863-869.
199. **Molina-Guijarro J.M., Perez J., Muñoz-Dorado J., Guillen F., Moya R., Hernández M., Arias M.E.** Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea* // *International Microbiology*. – 2009. – V. 12. – №1. – P. 13-21.
200. **Mollania N., Khajeh K., Ranjbar B., Hosseinkhani S.** Enhancement of a bacterial laccase thermostability through directed mutagenesis of a surface loop // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2011. – V. 49. – №5. – P. 446-452.
201. **Montealeali M.R., Della Seta L., Vastarella W., Pilloton R.** A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine // *Journal of Molecular Catalysis B*. – 2010. – V. 64. – №3-4. – P. 189-194.
202. **Morie-Bebel M.M., McMillin D.R., Antholine W.E.** Multi-frequency e.p.r. studies of a mercury-containing mixed-metal derivative of laccase // *Biochemical Journal*. – 1986. – V. 235. – №2. – P. 415-420.
203. **Mot A.C., Silaghi-Dumitrescu R.** Laccases: complex architectures for one electron oxidations // *Biochemistry (Moscow)*. – 2012. – V. 77. – №12. – P. 1395-1407.
204. **Mukhopadhyay A., Dasgupta A.K., Chakrabarti K.** Thermostability, pH stability and dye degrading activity of a bacterial laccase are enhanced in the presence of Cu₂O nanoparticles // *Bioresource Technology*. – 2013. – V. 127. – P. 25-36.
205. **Munoz C., Guillen F., Martinez A.T., Martinez M.J.** Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1997. – V. 63. – №6. – P. 2166-2174.
206. **Murphy M.E., Lindley P.F., Adman E.T.** Structural comparison of cupredoxin domains: domain recycling to construct proteins with novel functions // *Protein Science*. – 1997. – V. 6. – №4. – P. 761-770.

207. **Nagai M., Kawata M., Watanabe H., Ogawa M., Saito K., Takesawa T., Kanda K., Sato T.** Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies // *Microbiology*. – 2003. – V. 149. – Pt 9. – P. 2455-2462.
208. **Nagai M., Sato T., Watanabe H., Saito K., Kawata M., Enei H.** Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – V. 60. – №3. – P. 327-335.
209. **Nakamura K., Go N.** Function and molecular evolution of multicopper blue proteins // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2005. – V. 62. – №18. – P. 2050-2066.
210. **Nakamura K., Kawabata T., Yura K., Go N.** Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution / *FEBS Letters*. – 2003. – V. 553. – №3. – P. 239-244.
211. **Nersissian A.M., Shipp E.L.** Blue copper-binding domains // *Advances in Protein Chemistry*. – 2002. – V. 60. – P. 271-340.
212. **Ng T.B., Wang H.X.** A homodimeric laccase with unique characteristics from the yellow mushroom *Cantharellus cibarius* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – V. 313. – №1. – P. 37-41.
213. **Niladevi K.N., Jacob N., Prema P.** Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: purification and characterization // *Process Biochemistry*. – 2008. – V. 43. – №6. – P. 654-660.
214. **Nishibori N., Masaki K., Tsuchioka H., Fujii T., Iefuji H.** Comparison of laccase production levels in *Pichia pastoris* and *Cryptococcus* sp. S-2 // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2013. – V. 115. – №4. – P. 394-399.
215. **Nitheranont T., Watanabe A., Asada Y.** Extracellular laccase produced by an edible basidiomycetous mushroom, *Grifola frondosa*: purification and characterization // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2011. – V. 75. – №3. – P. 538-543.
216. **Osma J.F., Toca-Herrera J.L., Rodríguez-Couto S.** Uses of laccases in the food industry // *Enzyme Research*. – 2010. – V. 2010. – P. 1-8.
217. **Otsuka Saito K., Ikeda R., Endo K., Tsujino Y., Takagi M., Tamiya E.** Isolation of a novel alkaline-induced laccase from *Flammulina velutipes* and its application for hair coloring // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2012. – V. 113. – №5. – P. 575-579.

218. **Otto B., Schlosser D.** First laccase in green algae: purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from *Tetracystis aerea* // *Planta*. – 2014. – V. 240. – №6. – P. 1225-1236.
219. **Otto B., Schlosser D., Reisser W.** First description of a laccase-like enzyme in soil algae // *Archives of Microbiology*. – 2010. – V. 192. – №9. – P. 759-768.
220. **Palmer A.E., Lee S.K., Solomon E.I.** Decay of the peroxide intermediate in laccase: reductive cleavage of the O-O bond // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – V. 123. – №27. – P. 6591-6599.
221. **Palmieri G., Cennamo G., Faraco V., Amoresano A., Sannia G., Giardina P.** Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2003. – V. 33. – №2-3. – P. 220-230.
222. **Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A., Sannia G.** A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus* // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – V. 272. – №50. – P. 31301-31307.
223. **Pan J.-B., Zhao M., Lu L., Du M.-H., Li G.-F., Li J., Wang T.-N., Tang X.-L.** Isolation and characterization of laccase activity in a novel *Bacillus amyloliquefaciens* LC02 // *Advanced Materials Research*. – 2011. – V. 183-185. – P. 773-777.
224. **Pan K., Zhao N., Yin Q., Zhang T., Xu X., Fang W., Hong Y., Fang Z., Xiao Y.** Induction of a laccase Lcc9 from *Coprinopsis cinerea* by fungal coculture and its application on indigo dye decolorization // *Bioresource Technology*. – 2014. – V. 162. – P. 45-52.
225. **Park N., Park S.S.** Purification and characterization of a novel laccase from *Fomitopsis pinicola* mycelia // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2014. – V. 70. – P. 583-589.
226. **Patel S.K., Kalia V.C., Choi J.H., Haw J.R., Kim I.W., Lee J.K.** Immobilization of laccase on SiO₂ nanocarriers improves its stability and reusability // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – V. 24. – №5. – P. 639-647.
227. **Pawlik A., Wojcik M., Rulka K., Motyl-Gorzal K., Osinska-Jaroszuk M., Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A., Rogalski J., Janusz G.** Purification and characterization of laccase from *Sinorhizobium meliloti* and analysis of the *lacc* gene // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – V. 92. – P. 138-147.
228. **Penketh G.E.** The oxidation potentials of phenolic and amino antioxidants // *Journal of Applied Chemistry*. – 1957. – V. 7. – №9. – P. 512-521.

229. **Perez J., Jeffries T.W.** Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium* // Applied and Environmental Microbiology. – 1992. – V. 58. – №8. – P. 2402-2409.
230. **Perry C.R., Matcham S.E., Wood D.A., Thurston C.F.** The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus* // Journal of General Microbiology. – 1993. – V. 139. – P. 171-178.
231. **Pezet R., Pont V., Hoang-Van K.** Enzymatic detoxication of stilbenes by *Botrytis cinerea* and inhibition by grape berries proanthocyanidins // In: Verhoeff, K., Malathrakis, N.E., Williamson, B. (Eds.), Recent Advances in Botrytis Research. Pudoc Scientific, Wageningen. – 1992. – P. 87-92.
232. **Pezzella C., Guarino L., Piscitelli A.** How to enjoy laccases // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2015. – V. 72. – №5. – P. 923-940.
233. **Piontek K., Antorini M., Choinowski T.** Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90- Å resolution containing a full complement of coppers // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – V. 277. – №40. – P. 37663-37669.
234. **Pogni R., Baratto M.C., Sinicropi A., Basosi R.** Spectroscopic and computational characterization of laccases and their substrate radical intermediates // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2015. – V. 72. – №5. – P. 885-896.
235. **Prasad K.K., Mohan S.V., Bhaskar Y.V., Ramanaiah S.V., Babu V.L., Pati B.R., Sarma P.N.** Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions // The Journal of Microbiology. – 2005. – V. 43. – №3. – P. 301-307.
236. **Qiu Y., Davis M.J., Dayrit J.K., Hadd Z., Meister D.L., Osterholzer J.J., Williamson P.R., Olszewski M.A.** Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice // PLoS One. – 2012. – V. 7. – №10. – P. e47853.
237. **Qiu W., Zhang W., Chen H.** Flavonoid-rich plants used as sole substrate to induce the solid-state fermentation of laccase // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2014. – V. 172. – №7. – P. 3583-3592.
238. **Quaratino D., Federici F., Petruccioli M., Fenice M., D'Annibale A.** Production, purification and partial characterization of a novel laccase from the white-rot fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79. // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2007. – V. 91. – №1. – P. 57-69.
239. **Quintanar L., Yoon J., Aznar C.P., Palmer A.E., Andersson K.K., Britt R.D., Solomon E.I.** Spectroscopic and electronic structure studies of the trinuclear Cu cluster active

- site of the multicopper oxidase laccase: nature of its coordination unsaturation // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – V. 127. – №40. – P. 13832-13845.
240. **Ramsay J.A., Nguyen T.** Decolourization of textile dyes by *Trametes versicolour* and its effect on dye toxicity // *Biotechnology Letters*. – 2002. – V. 24. – №11. – P. 1757-1761.
241. **Rasekh B., Khajeh K., Ranjbar B., Mollania N., Almasinia B., Tirandaz H.** Protein engineering of laccase to enhance its activity and stability in the presence of organic solvents // *Engineering in Life Sciences*. – 2014. – V. 00. – P. 1-7.
242. **Reinhammar B.** In *Copper Proteins and Copper Enzymes* // Lontie, R., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL. – 1984. – V. 3. – P. 1-35.
243. **Reinhammar B.R., Vanngard T.I.** The electron-accepting sites in *Rhus vernicifera* laccase as studied by anaerobic oxidation-reduction titrations // *European Journal of Biochemistry*. – 1971. – V. 18. – №4. – P. 463-468.
244. **Reiss R., Ihssen J., L. Thony-Meyer L.** *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum // *BMC Biotechnology*. – 2011. – V. 11. – P. 9.
245. **Reiss R., Ihssen J., Richter M., Eichhorn E., Schilling B., Thony-Meyer L.** Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – №6. – P. e65633.
246. **Ricklefs E., Winkler N., Koschorreck K., Urlacher V.B.** Expanding the laccase-toolbox: a laccase from *Corynebacterium glutamicum* with phenol coupling and cuprous oxidase activity // *Journal of Biotechnology*. – 2014. – V. 191. – P. 46-53.
247. **Ritter G., Maier G., Schoepplein E., Dietrich H.** The application of polyphenoloxidase in the processing of apple juice // *Bulletin de Liaison-Groupe Polyphenols*. – 1992. – V. 16. – P. 209-212.
248. **Rivera-Hoyos C.M., Morales-Alvarez E.D., Poutou-Pinales R.A., Pedroza-Rodriguez A.M., Rodriguez-Vazquez R., Delgado-Boada J.M.** Fungal laccases // *Fungal Biology Reviews*. – 2013. – V. 27. – №3-4. – P. 67–82.
249. **Roberts S.A., Weichsel A., Grass G., Thakali K., Hazzard J.T., Tollin G., Rensing C., Montfort W.R.** Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – V. 99. – №5. – P. 2766-2771.
250. **Rogalski J., Janusz G.** Purification of extracellular laccase from *Cerrena unicolor* // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. – 2010. – V. 40. – №4. – P. 242-255.

251. **Ruijsenaars H.J., Hartmans S.** A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2004. – V. 65. – №2. – P. 177-182.
252. **Rulisek L., Solomon E.I., Ryde U.** A combined quantum and molecular mechanical study of the O₂ reductive cleavage in the catalytic cycle of multicopper oxidases // *Inorganic Chemistry*. – 2005. – V. 44. – №16. – P. 5612-5628.
253. **Ryden L.G., Hunt L.T.** Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins // *Journal of Molecular Evolution*. – 1993. – V. 36. – №1. – P. 41-66.
254. **Safary A., Moniri R., Hamzeh-Mivehroud M., Dastmalchi S.** A strategy for soluble overexpression and biochemical characterization of halo-thermotolerant *Bacillus* laccase in modified *E. coli* // *Journal of Biotechnology*. – 2016. – V. 227. – P. 56-63.
255. **Santhanam N., Vivanco J.M., Decker S.R., Reardon K.F.** Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style // *Trends in Biotechnology*. – 2011. – V. 29. – №10. – P. 480-489.
256. **Saparrat M.C.N., Guillen F., Arambarri A.M., Martinez A.T., Martinez M.J.** Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Corioloropsis rigida* // *Applied and Environmental Microbiology* – 2002. – V. 68. – P. 1534-1540.
257. **Schlosser D., Grey R., Fritsche W.** Patterns of ligninolytic enzymes in *T. versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1997. – V. 47. – №4. – P. 412–418.
258. **Schneider K.P., Gewessler U., Flock T., Heinzle A., Schenk V., Kaufmann F., Sigl E., Guebitz G.M.** Signal enhancement in polysaccharide based sensors for infections by incorporation of chemically modified laccase // *New Biotechnology*. – 2012. – V. 29. – №4. – P. 502-509.
259. **Schneider P., Caspersen M.B., Mondorf K., Halkier T., Skov L.K., Ostergaard P.R., Brown K.M., Brown S.H., Xu F.** Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1999. – V. 25. – №6. – P. 502-508.
260. **Schuckel J., Matura A., van Pee K.H.** One-copper laccase-related enzyme from *Marasmius* sp.: purification, characterization and bleaching of textile dyes // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2011. – V. 48. – №3. – P. 278-284.

261. **Seki M., Oikawa J., Taguchi T., Ohnuki T., Muramatsu Y., Sakamoto K., Amachi S.** Laccase-catalyzed oxidation of iodide and formation of organically bound iodine in soils // *Environmental Science and Technology*. – 2012. – V. 47. – №1. – P. 390-397.
262. **Sheikhi F., Roayaei Ardakani M., Enayatizamir N., Rodriguez-Couto S.** The determination of assay for laccase of *Bacillus subtilis* WPI with two classes of chemical compounds as substrates // *Indian Journal of Microbiology*. – 2012. – V. 52. – №4. – P. 701-707.
263. **Shen B.W., Spiegel P.C., Chang C.H., Huh J.W., Lee J.S., Kim J., Kim Y.H., Stoddard B.L.** The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII // *Blood*. – 2008. – V. 111. – №3. – P. 1240-1247.
264. **Sherif M., Waung D., Korbeci B., Mavisakalyan V., Flick R., Brown G., Abou-Zaid M., Yakunin A.F., Master E.R.** Biochemical studies of the multicopper oxidase (small laccase) from *Streptomyces coelicolor* using bioactive phytochemicals and site-directed mutagenesis // *Microbial Biotechnology*. – 2013. – V.6. – №5. – P. 588-597.
265. **Shi X., Liu Q., Ma J., Liao H., Xiong X., Zhang K., Wang T., Liu X., Xu T., Yuan S., Zhang X., Zhu Y.** An acid-stable bacterial laccase identified from the endophyte *Pantoea ananatis* Sd-1 genome exhibiting lignin degradation and dye decolorization abilities // *Biotechnology Letters*. – 2015. – V. 37. – №11. – P. 2279-2288.
266. **Shi Y., Chai L., Tang C., Yang Z., Zhang H., Chen R., Chen Y., Zheng Y.** Characterization and genomic analysis of kraft lignin biodegradation by the beta-proteobacterium *Cupriavidus basilensis* B-8 // *Biotechnology for Biofuels*. – 2013b. – V. 6. – P. 1.
267. **Shi Y., Chai L., Tang C., Yang Z., Zheng Y., Chen Y., Jing Q.** Biochemical investigation of kraft lignin degradation by *Pandoraea* sp. B-6 isolated from bamboo slips // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2013a. – V. 36. – №12. – P. 1957-1965.
268. **Shiba T., Xiao L., Miyakoshi T., Chen C.L.** Oxidation of isoeugenol and coniferyl alcohol catalyzed by laccases isolated from *Rhus vernicifera* Stokes and *Pycnoporus coccineus* // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2000. – V. 10. – №6. – P. 605-615.
269. **Shin W., Sundaram U.M., Cole J.L., Zhang H.H., Hedman B., Hodgson K.O., Solomon E.I.** Chemical and spectroscopic definition of the peroxide-level intermediate in the multicopper oxidases: relevance to the catalytic mechanism of dioxygen reduction to water // *Journal of the American Chemical Society*. – 1996. – V. 118. – P. 3202-3215.
270. **Shleev S., Jarosz-Wilkolazka A., Khalunina A., Morozova O., Yaropolov A., Ruzgas T., Gorton L.** Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes // *Bioelectrochemistry*. – 2005. – V. 67. – №1. – P. 115-124.

271. **Shleev S., Reimann C.T., Serezhenkov V., Burbaev D., Yaropolov A.I., Gorton L., Ruzgas T.** Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible correlation with a resting form of laccase // *Biochimie.* – 2006. – V. 88. – №9. – P. 1275-1285.
272. **Shleev S.V., Morozova O., Nikitina O., Gorshina E.S., Rusinova T., Serezhenkov V.A., Burbaev D.S., Gazaryan I.G., Yaropolov A.I.** Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes // *Biochimie.* – 2004. – V. 86. – №9-10. – P. 693-703.
273. **Shraddha, Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A.** Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications // *Enzyme Research.* – 2011. – V. 2011. – P. 1-11.
274. **Si J.Q.** Patent US №6296883 B1 «Use of laccase in baking industry». – 1994.
275. **Si W., Wu Z., Wang L., Yang M., Zhao X.** Enzymological characterization of Atm, the first laccase from *Agrobacterium* sp. S5-1, with the ability to enhance in vitro digestibility of maize straw // *PLoS One.* – 2015. – V. 10. – №5. – P. e0128204.
276. **Silverio S.C., Moreira S., Milagres A.M., Macedo E.A., Teixeira J.A., Mussatto S.I.** Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora cinerea* and *Trametes versicolor*: a comparative study // *Bioprocess and Biosystems Engineering.* – 2013. – V. 36. – №3. – P. 365-373.
277. **Singh G., Capalash N., Goel R., Sharma P.** A pH-stable laccase from alkali-tolerant γ -proteobacterium JB: Purification, characterization and indigo carmine degradation // *Enzyme and Microbial Technology.* – 2007. – V. 41. – №6-7. – P. 794-799.
278. **Skalova T., Dohnalek J., Ostergaard L.H., Ostergaard P.R., Kolenko P., Duskova J., Stepankova A., Hasek J.** The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases // *Journal of Molecular Biology.* – 2009. – V. 385. – №4. – P. 1165-1178.
279. **Solomon E.I., Baldwin M.J., Lowery M.D.** Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity // *Chemical Reviews.* – 1992. – V. 92. – №4. – P. 521-542.
280. **Solomon E.I., Chen P., Metz M., Lee S.K., Palmer A.E.** Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins // *Angewandte Chemie.* – 2001. – V. 40. – №24. – P. 4570-4590.
281. **Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E.** Multicopper oxidases and oxygenases // *Chemical Reviews.* – 1996. – V. 96. – №7. – P. 2563-2605.

282. **Solomon E.I., Szilagy R.K., DeBeer George S., Basumallick L.** Electronic structures of metal sites in proteins and models: contributions to function in blue copper proteins // *Chemical Reviews*. – 2004. – V. 104. – №2. – P. 419-458.
283. **Solomon E.I., Tuzek F., Root D.E., Brown C.A.** Spectroscopy of binuclear dioxygen complexes // *Chemical Reviews*. – 1994. – V. 94. – №3. – P. 827-856.
284. **Spina F., Junghanns C., Donelli I., Nair R., Demarche P., Romagnolo A., Freddi G., Agathos S.N., Varese G.C.** Stimulation of laccases from *Trametes pubescens*: use in dye decolorization and cotton bleaching // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. – 2016. – V. 46. – №7. – P. 639-647.
285. **Sterjiades R., Dean J.F., Eriksson K.E.** Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols // *Plant Physiology*. – 1992. – V. 99. – №3. – P. 1162-1168.
286. **Stutz C.** The use of enzymes in ultrafiltration // *Fruit Processing (Germany)*. – 1993. – V. 3. – P. 248-252.
287. **Suzuki T., Endo K., Ito M., Tsujibo H., Miyamoto K., Inamori Y.** A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2003. – V. 67. – №10. – P. 2167-2175.
288. **Svobodova K.** The implications of ligninolytic enzymes in the decolorization of synthetic dyes by the white-rot fungus *Irpex lacteus* // PhD Thesis, Charles University, Prague, Czech Republic. – 2005.
289. **Tamaki H., Matsuoka T., Yasuda Y., Hanada S., Kamagata Y., Nakamura K., Sakasegawa S.** A novel laccase with urate oxidation activity from *Lysobacter* sp. T-15 // *Journal of Biochemistry*. – 2010. – V. 148. – №4. – P. 481-489.
290. **Telke A.A., Ghodake G.S., Kalyani D.C., Dhanve R.S., Govindwar S.P.** Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. ADR // *Bioresource Technology*. – 2011. – V. 102. – №2. – P. 1752-1756.
291. **Tellez-Jurado A., Arana-Cuenca A., Gonzalez Becerra A.E., Viniestra-Gonzalez G., Loera O.** Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – V. 38. – №1. – P. 665-669.
292. **Thakker G.D., Evans C.S., Rao K.K.** Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1992. – V. 37. – №3. – P. 321-323.

293. **Thurston C.F.** The structure and function of fungal laccases // *Microbiology*. – 1994. – V. 140. – P. 19-26.
294. **Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Trubitsina L., Lisov A., Zakharova M., Leontievsky A.** Crystallization and X-ray diffraction studies of a two-domain laccase from *Streptomyces griseoflavus* // *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications*. – 2015. – V. 71. – Pt 9. – P. 1200-1204.
295. **Trubitsina L.I., Tishchenko S.V., Gabdulkhakov A.G., Lisov A.V., Zakharova M.V., Leontievsky A.A.** Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes* // *Biochimie*. – 2015. – V. 112. – P. 151-159.
296. **Uchida H., Fukuda T., Miyamoto H., Kawabata T., Suzuki M., Uwajima T.** Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2001. – V. 287. – №2. – P. 355-358.
297. **Udayasoorian C., Prabu P.C.** Biodegradation of phenols by lignolytic fungus *Trametes versicolour* // *Journal of Biological Sciences*. – 2005. – V. 5. – №6. – P. 824-827.
298. **Uthandi S., Saad B., Humbard M.A., Maupin-Furlow J.A.** LccA, an archaeal laccase secreted as a highly stable glycoprotein into the extracellular medium by *Haloferax volcanii* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010. – V. 76. – №3. – P. 733-743.
299. **Uzan E., Nousiainen P., Balland V., Sipila J., Piumi F., Navarro D., Asther M., Record E., Lomascolo A.** High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications // *Journal of Applied Microbiology*. – 2010. – V. 108. – №6. – P. 2199-2213.
300. **Valaskova V., Baldrian P.** Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus* // *Research in Microbiology*. – 2006. – V. 157. – №2. – P. 119-124.
301. **Velasco L., Mesa S., Delgado M.J., Bedmar E.J.** Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum* // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2001. – V. 1521. – №1-3. – P. 130-134.
302. **Viterbo A., Yagen B., Mayer A.M.** Cucurbitacins, ‘attack’ enzymes and laccase in *Botrytis cinerea* // *Polytochemistry*. – 1993. – V. 32. – №1. – P. 61-65.
303. **Wahleithner J.A., Xu F., Brown K.M., Brown S.H., Golightly E.J., Halkier T., Kauppinen S., Pederson A., Schneider P.** The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* // *Current Genetics*. – 1996. – V. 29. – №4. – P. 395-403.

304. **Walker J.R.L., McCallion R.F.** The selective inhibition of *ortho*- and *para*-diphenol oxidases // *Phytochemistry*. – 1980. – V. 19. – №3. – P. 373-377.
305. **Wang W., Liu F., Jiang Y., Wu G., Guo L., Chen R., Chen B., Lu Y., Dai Y., Xie B.** The multigene family of fungal laccases and their expression in the white rot basidiomycete *Flammulina velutipes* // *Gene*. – 2015. – V. 563. – №2. – P. 142-149.
306. **Wilkinson B., Bachmann B.O.** Biocatalysis in pharmaceutical preparation and alteration // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2006. – V. 10. – №2 – P. 169-176.
307. **Williamson P.R.** Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase // *Journal of Bacteriology*. – 1994. – V. 176. – №3. – P. 656-664.
308. **Williamson P.R.** Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* // *Frontiers in Bioscience*. – 1997. – V. 2. – P. e99-107.
309. **Wood D.A.** Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus* // *Journal of General Microbiology*. – 1980. – V. 117. – P 327-338.
310. **Wu J., Kim K.-S., Lee J.-H., Lee Y.-C.** Cloning, expression in *Escherichia coli*, and enzymatic properties of laccase from *Aeromonas hydrophila* WL-11 // *Journal of Environmental Sciences*. – 2010. – V. 22. – №4. – P. 635-640.
311. **Xu F.** Effects of redox potential and hydroxyl inhibition on the pH activity profile on fungal laccases // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – V. 272. – №2. – P. 942-928.
312. **Xu F.** Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition // *Biochemistry*. – 1996. – V. 35. – №23. – P. 7608-7614.
313. **Xu F., Berka R.M., Wahleithner J.A., Nelson B.A., Shuster J.R., Brown S.H., Palmer A.E., Solomon E.I.** Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile // *Journal of Biochemistry*. – 1998. – V. 334. – №1. – 63-70.
314. **Xu F., Kulys J.J., Duke K., Li K.C., Krikstopaitis K., Deussen H.J.W., Abbate E, Galinyte V., Schneider P.** Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – V. 66. – №5. – P. 2052-2056.
315. **Xu F., Palmer A.E., Yaver D.S., Berka R.M., Gambetta G.A., Brown S.H., Solomon E.I.** Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase. Axial perturbations of the T1 copper // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274. – №18. – P. 12372-12375.
316. **Yang J., Ng T.B., Lin J., Ye X.** A novel laccase from basidiomycete *Cerrena* sp.: cloning, heterologous expression, and characterization // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2015. – V. 77. – P. 344-349.

317. **Yaropolov A.I., Skorobogat'ko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeyev S.D.** Laccase properties, catalytic mechanism, and applicability // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 1994. – V. 49. – №3. – P. 257-280.
318. **Yaver D.S., Xu F., Golightly E.J., Brown K.M., Brown S.H., Rey M.W., Schneider P., Halkier T., Mondorf K., Dalboge H.** Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – V. 62. – №3. – P. 834-841.
319. **Ye M., Li G., Liang W.Q., Liu Y.H.** Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived multicopper oxidase with alkaline laccase activity and highly soluble expression // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – V. 87. – №3. – P. 1023-1031.
320. **Yoshida H.** Chemistry of lacquer (Urushi) // *Journal of the Chemical Society*. – 1883. – V. 43. – P. 472-486.
321. **Yoshitake A., Katayama Y., Nakamura M., Iimura Y., Kawai S., Morohoshi N.** N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor* // *Journal of General Microbiology*. – 1993. – V. 139. – P. 179-185.
322. **Yu Y., Wang Q., Yuan J., Fan X., Wang P., Cui L.** Hydrophobic modification of cotton fabric with octadecylamine via laccase/TEMPO mediated grafting // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – V. 137. – P. 549-555.
323. **Zhang C., Diao H., Lu F., Bie X., Wang Y., Lu Z.** Degradation of triphenylmethane dyes using a temperature and pH stable spore laccase from a novel strain of *Bacillus vallismortis* // *Bioresour Technology* – 2012. – V. 126. – P. 80-86.
324. **Zhao D., Zhang X., Cui D., Zhao M.** Characterisation of a novel white laccase from the deuteromycete fungus *Myrothecium verrucaria* NF-05 and its decolourisation of dyes // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – №6. – P. e38817.
325. **Zhao Q., Nakashima J., Chen F., Yin Y., Fu C., Yun J., Shao H., Wang X., Wang Z.Y., Dixon R.A.** Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. – 2013. – V. 25. – №10. – P. 3976-3987.
326. **Zheng Z., Li H., Li L., Shao W.** Biobleaching of wheat straw pulp with recombinant laccase from the hyperthermophilic *Thermus thermophilus* // *Biotechnology Letters*. – 2012. – V. 34. – №3. – P. 541-547.
327. **Zoppellaro G., Sakurai T., Huang H.** A novel mixed valence form of *Rhus vernicifera* laccase and its reaction with dioxygen to give a peroxide intermediate bound to the trinuclear center // *The Journal of Biochemistry (Tokyo)*. – 2001. – V. 129. – P. 949-953.

328. **Zouari N., Romette J.L., Thomas D.** Purification and properties of two laccase isoenzymes produced by *Botrytis cinerea* // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 1987. – V. 15. – №3. – P. 213-225.