

С. В. Киселева (асп.), Э. Р. Насибуллина (студ.), Д. М. Аминева (студ.),
А. Д. Гарифуллина (студ.), Н. Н. Руднева (студ.), Л. Х. Халимова (к.т.н., доц.)

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА И ОЦЕНКА ДЕСТРУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛАККАЗЫ ГРИБА *FOMES FOMENTARIUS* ВКПМ F-1531

Уфимский государственный нефтяной технический университет,
кафедра биохимии и технологии микробиологических производств
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1; e-mail: kiselevabtmp@gmail.com

S. V. Kiseleva, E. R. Nasibullina, D. M. Amineva,
A. D. Garifullina, N. N. Rudneva, L. Kh. Khalimova

OPTIMIZATION OF CONDITIONS OF SYNTHESIS AND EVALUATION OF DESTRUCTIVE POTENTIAL OF LACCASE FROM *FOMES FOMENTARIUS* VKPM F-1531

Ufa State Petroleum Technological University
1, Kosmonavtov Str., 450064, Ufa, Russia; e-mail: kiselevabtmp@gmail.com

С целью получения высокоактивных внеклеточных препаратов лакказы гриба *F. fomentarius* F-1531 изучено влияние начального pH среды, а также наличия эффективного индуктора/стимуляторов в среде (сульфата меди, лигносульфоната, пирокатехина, экстракта опилок, этанола, глицерина, льняной муки) на продукцию оксидазных ферментов с лакказной активностью в процессе жидкофазного роста. Оптимальные условия синтеза соответствовали максимальной лакказной активности культуральных жидкостей, полученных при росте гриба на модифицированной глюкозо-пептонной среде (200 мг/л CuSO_4) в присутствии этанола (1%) или экстракта опилок лиственных пород (1%). Полученные неочищенные и очищенные препараты лакказы *F. fomentarius* F-1531 использованы для изучения деградации фенола в концентрации 250-500-1000 мг/л, в результате которой формировались нерастворимые в воде осадки продуктов окисления темно-бурого цвета с выходом 60–80 %. Основным мономерным продуктом окисления фенола очищенной лакказой (760 ед/мл) являлся пирокатехин, обнаруженный методом хромато-масс-спектрометрии в супернатантах реакционной смеси в начальный период трансформации.

Ключевые слова: базидиомицеты; гриб *Fomes fomentarius*; деструкция; лакказа; оптимизация; поликатехолы; фенол.

In order to obtain highly active extracellular preparations of laccase from the fungus *F. fomentarius* F-1531, we studied the effect of the initial pH of the medium, the presence of effective inducer/stimulators in the medium (copper sulfate, lignosulfonate, catechol, sawdust extract, ethanol, glycerin, flax flour) on the production of oxidase enzymes with laccase activity during liquid cultivation. The optimal synthesis conditions corresponded to the maximum laccase activity of culture liquids, which were obtained during the cultivation of strain on a modified glucose-peptone medium (200 mg/l CuSO_4) in the presence of ethanol (1%) or hardwood sawdust extract (1%). The crude and purified laccase of *F. fomentarius* F-1531 were used to study the degradation of phenol at concentrations of 250-500-1000 mg/l, with the formation of water-insoluble precipitates of dark brown oxidation products with a yield of 60–80 %. The main monomeric product of phenol oxidation with purified laccase (760 U/ml) was pyrocatechin, which was detected by chromat-mass spectrometry in the supernatants of the reaction mixture in the initial period of transformation.

Key words: basidiomycetes; destruction; laccase; optimization; mushroom *Fomes fomentarius*; polycatechols; phenol.

Лакказы базидиомицетов являются мощным инструментом в вопросах биоремедиации окружающей среды от ксенобиотиков, в первую очередь, фенола и фенолсодержащих продуктов, относящихся к наиболее распространенным и токсичным веществам после нефтепродуктов и тяжелых металлов¹⁻³. При этом медьсодержащие ферменты лакказы, как известно, катализируют одноэлектронное восстановление O_2 до H_2O и одноэлектронное окисление органических субстратов, преимущественно фенольных соединений, в соответствующие феноксирадикалы, отличающиеся нестабильностью и повышенной токсичностью, которые далее вступают в реакции полимеризации с образованием высокомолекулярных продуктов, что приводит к удалению их из среды⁴⁻⁶.

Современное направление, связанное с использованием оксидазных ферментов микроорганизмов, например, в области экологии, для удаления фенолов из продуктов питания, детекции и мониторинге фенолсодержащих продуктов в проблемных акваториях/территориях, биологической очистки сточных вод и выбросов промышленных предприятий и т.п. направлено на интенсификацию производства таких ферментных препаратов и их удешевление^{7,8}.

В качестве объекта изучения рассматривали выделенный нами изолят ксилотрофного базидиомицета штамм *F. fomentarius* F-1531 – продуцент лакказных ферментов.

В настоящей работе с целью оптимизации условий синтеза внеклеточных фенолоксидазных ферментов гриба *F. fomentarius* F-1531 исследовано влияние начального показателя pH среды и стимуляторов синтеза лакказы.

Поиск оптимальных условий биосинтеза осуществляли в процессе поверхностного культивирования гриба *F. fomentarius* F-1531 на жидких средах в стационарных условиях при 22 °C. В качестве контрольного варианта использовали оптимизированную глюкозо-пептонную среду (ГПС), содержащую 1.4% глюкозы⁹⁻¹¹.

Известно, что индукторами многочисленных индуцибельных ферментов являются субстраты, а также отдельные соединения, влияющие на экспрессию генов, кодирующих синтез ферментов. Синтез ферментов лакказы у микроорганизмов кодируется семейством генов и продуцируется в форме множества изоферментов¹². Так, в ряде работ было показано, что для ксилотрофных базидиомицетов, продуцирующих, в первую очередь, оксидазные ферменты лакказы, гены, кодирующие изоферменты лакказы, могут регулироваться по-разному⁸⁻¹⁰. Наиболее часто среди индукторов лакказы выступает медь как главный элемент каталитического центра лакказы, осуществляющий перенос электронов¹³.

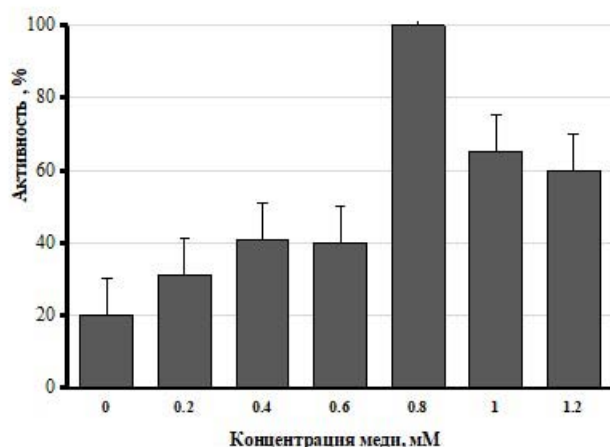
Для представителей наиболее изученных продуцентов лакказы – грибов рода *Trametes* (*T. versicolor*, *T. hirsuta* и др.) получены данные по стимулированию синтеза лакказ в присутствии спиртов: этанола, глицерина, толуола; лигнинных соединений на основе экстрактов опилок или нативных опилок; субстратов действия лакказы (галловой кислоты, гваякола, ABTS и др.). Так, некоторые из них экспрессируются конститутивно, другие экспрессируются при индукции такими ароматическими соединениями лигнинов, как крафт-лигнин, ксилитин, вератриловый спирт и др.¹⁴⁻¹⁶.

О синтезе внеклеточных фенолоксидазных ферментов в процессе культивирования судили по уровню окислительной активности культуральной жидкости в реакции окисления пирокатехина. Данные в пользу введения в состав среды ГПС (КС), этанола или глицерина с целью повышения внеклеточной фенолоксидазной активности, в том числе гриба *F. fomentarius* F-1531, были показаны ранее⁹⁻¹¹.

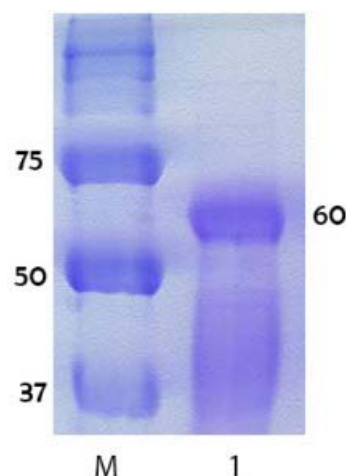
Известны работы по исследованию условий оптимизации синтеза лакказ ксилотрофного гриба *Fomes fomentarius*. Так, для штамма *Fomes fomentarius* MUCL 35117 показана индукция синтеза лакказы гриба на среде, содержащей пшеничные отруби с 2 мМ сульфата меди. При этом лакказная активность препарата составила 27 ед/мл¹⁷. Оптимизация среды для максимальной продукции лакказы грибом *F. fomentarius* BM-745 проведена в присутствии только комплексных источников органического азота – дрожжевого экстракта и пептона¹⁸. Для штамма *Fomes fomentarius* (CCBAS 534) показано, что для высокого синтеза лакказы необходима целлюлоза в качестве источника углерода без внесения азота в среду¹⁹.

Ранее нами были изучены условия синтеза лакказ в присутствии ионов меди и определена оптимальная концентрация в среде, соответствующая 200 мг/л (0.8 мМ), рис. 1А²⁰.

С целью получения высокоактивных препаратов лакказы гриба *F. fomentarius* F-1531 и сравнения полученных максимальных активностей изучали влияние описанных в литературе разнообразных стимуляторов и индукторов синтеза лакказ для лигнинразрушающих грибов, в том числе, учитывая видовую принадлежность исследуемого гриба, те субстраты и индукторы, что оказывали заметное влияние на другие штаммы гриба *F. fomentarius*. Изучаемый ряд индукторов (этанол, глицерин; лигносульфонат; пирокатехин, льняная мука; опилки) вносили при засеве модифицированной питательной среды ГПС, содержащей 1.4 % глюкозы и соли меди (200 мг/л). Ионы меди во избежание ингибирования роста гриба вносили в питательную среду на 3 сут.



А



Б

Рис. 1. А – Профиль лакказной активности культуральной жидкости гриба *F. fomentarius* F-1531, полученный в процессе роста в присутствии различных концентраций CuSO_4 ; Б – Электрофореграмма очищенных препаратов лакказ *F. fomentarius* F-1531: М – маркерные белки (масса, кДа); 1 – очищенный ферментный препарат²⁰

Изучение динамики фенолоксидазной активности культуральной жидкости гриба *F. fomentarius* F-1531, полученной в присутствии различных индукторов показала, что практически для всех изучаемых потенциальных стимуляторов синтеза лакказы гриба, максимальная лакказная активность зарегистрирована примерно на 8-е сутки роста.

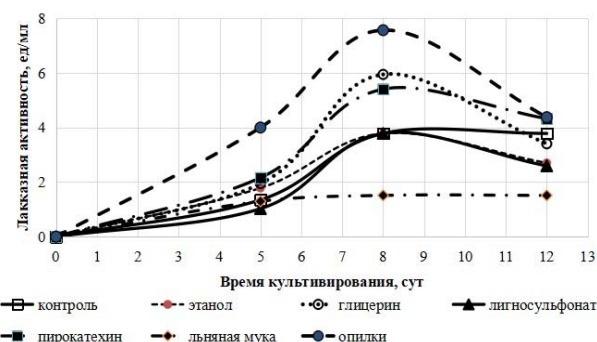


Рис. 2. Динамика синтеза лакказ гриба *F. fomentarius* F-1531 в присутствии потенциальных индукторов

В результате изучения динамики фенолоксидазной активности культуральной жидкости гриба *F. fomentarius* F-1531 в присутствии изучаемых стимуляторов-индукторов, максимальную активность наблюдали в присутствии опилок (1%), что в 2 раза больше варианта среды без добавок (контроль). Аналогично повышенный уровень активности гриба (в 1.5 раза больше контроля) наблюдали в присутствии глицерина (1%) и пирокатехина (0.0025%) как показано на рис. 2.

Таким образом, наиболее эффективным индуктором для синтеза лакказы гриба *F. fomentarius* F-1531 может быть добавление опилок (или их экстракта) к составу модифицированной среды ГПС. При этом продуктивность примерно в 2 раза больше, чем в контрольной среде (без опилок).

Наибольшую фенолоксидазную активность гриба *F. fomentarius* F-1531 на 8-е сутки наблюдали в вариантах среды с начальным показателем среды pH 4.5 и pH 5.0, что соответствовало активности 9.7 ед/мл и 10.5 ед/мл соответственно (рис. 3). Таким образом, в варианте питательной среды с начальным pH 5.0 формируется пул оксидазных ферментов, который достигает максимального значения (10.5 ед/мл на 8-е сутки).

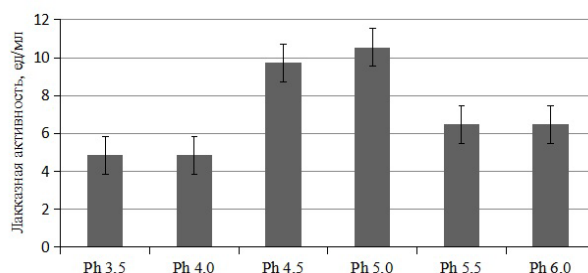
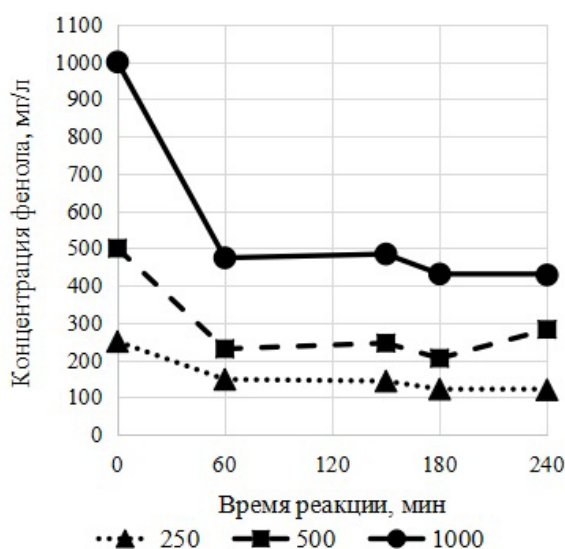
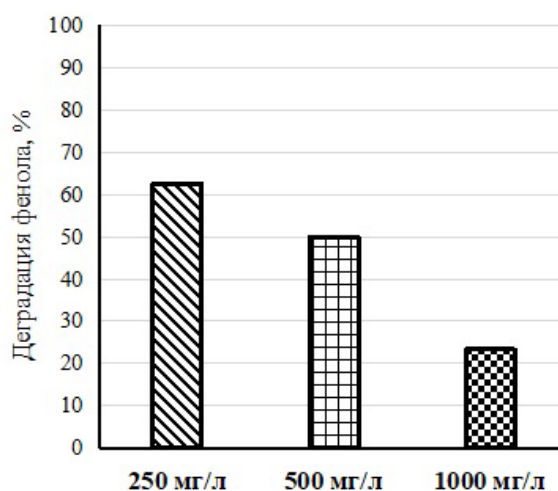


Рис. 3. Лакказная активность КЖ гриба *F. fomentarius* F-1531, выращенного на среде ГПС с разным начальным pH в течение 8 сут

Повышенные концентрации фенолов в сточных водах могут встречаться при залповых сбросах нефтехимических и химических производств, а также в сточных водах целлюлозно-бумажной промышленности (200–250 мг/л).



А



Б

Рис. 4. Динамика окисления фенола (250–500–1000 мг/л) в реакции трансформации препаратом культуральной жидкости гриба *F. fomentarius* F-1531: А – детекция фенола в УФ-области (ОД286); Б – деградация фенола (%) в течение 1 ч

В результате исследования процесса окисления фенола (250–500–1000 мг/л) препаратом лакказы (10 ед/мл) обнаружено, что в течение 60 мин в присутствии повышенных концентраций фенола скорость его деструкции тем выше, чем выше концентрация фенола в среде (рис. 4). Анализ скорости окисления фенола в зависимости от начальной концентрации указывает на наиболее интенсивные процессы окисления препаратами лакказы при повышенных концентрациях (1000 мг/л) – до 60% в течение 60 мин. Вследствие заметного снижения скорости окисления фенола после 60-минутной инкубации и малозаметной (еще на 5–7 %) в течение последующих 3 ч для варианта 1000 мг/л фенола и подобный же характер замедления скорости в других вариантах, мы предполагаем достаточно сильное ингибирование лакказы продуктами окисления фенола во всех исследуемых его концентрациях.

Анализ результатов деградации фенола (250–500–1000 мг/л) методом Фолина-Чокалтеу, в отличие от спектрофотометрического анализа в УФ-области, указывает на более высокую скорость окисления фенола (детекция фенольных групп) в случае более низкой начальной его концентрации – 250 мг/л (рис. 5).

Анализ остаточной активности приведен на рис. 6.

В результате трансформации фенола во всех вариантах его концентрации (250–500–1000 мг/л) через 15–20 мин наблюдалось интенсивное образование красно-бурого (с черным оттенком) осадка. (рис. 7).

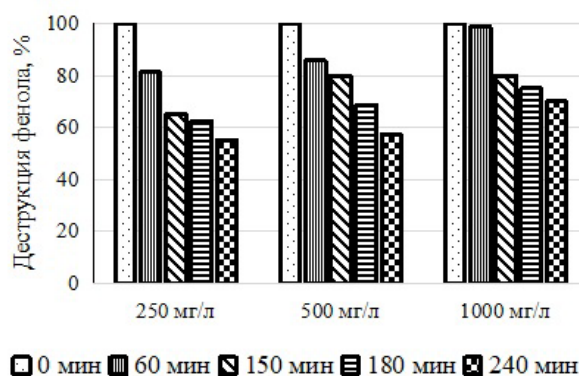


Рис. 5. Динамика окисления фенола (250–500–1000 мг/л) препаратами культуральной жидкости гриба *F. fomentarius* F-1531), детектируемого по методу Фолина-Чокалтеу

Условия трансформации: перемешивание (120 об/мин) реакционной смеси препаратов ЭПК с фенолом (250–1000 мг/л) в ацетатном буфере pH 5.0 в течение 3 ч.

По-видимому, выпадающие в осадок продукты окисления фенола могут быть результатом образования как ди- или тримеров на основе фенольных радикалов (рис. 8), так и полимеров, как описывают подобные продукты для лакказ базидиомицетов ^{7,12}.

Данные по растворимости образовавшегося осадка приведены в табл. 1.

В результате анализа осадков методом ИК-Фурье спектроскопии на базе лаборатории ИОХ УФИЦ РАН были получены спектры, представленные на рис. 9.

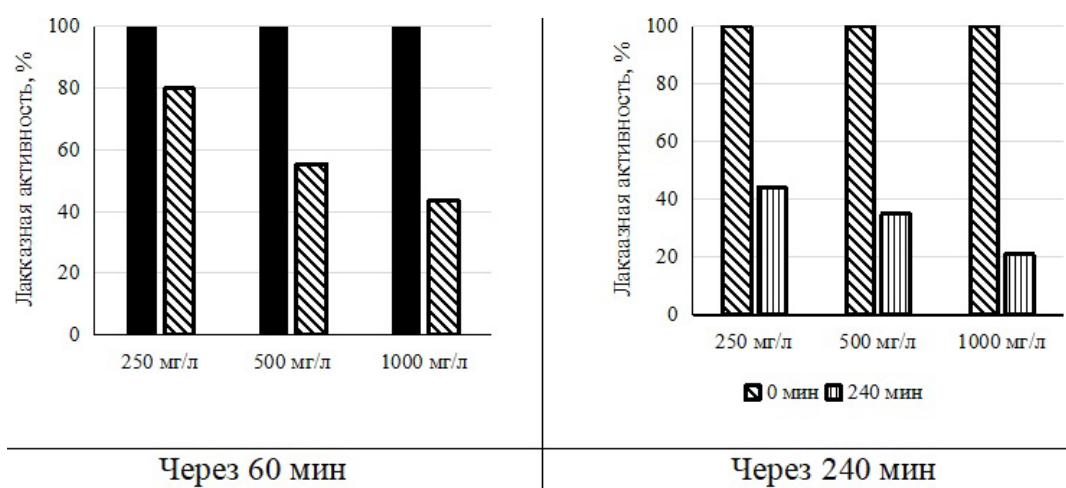


Рис. 6. Динамика фенолоксидазной активности в реакции трансформации фенола (250–500–1000 мг/л) препаратом лакказы (10 ед/мл)

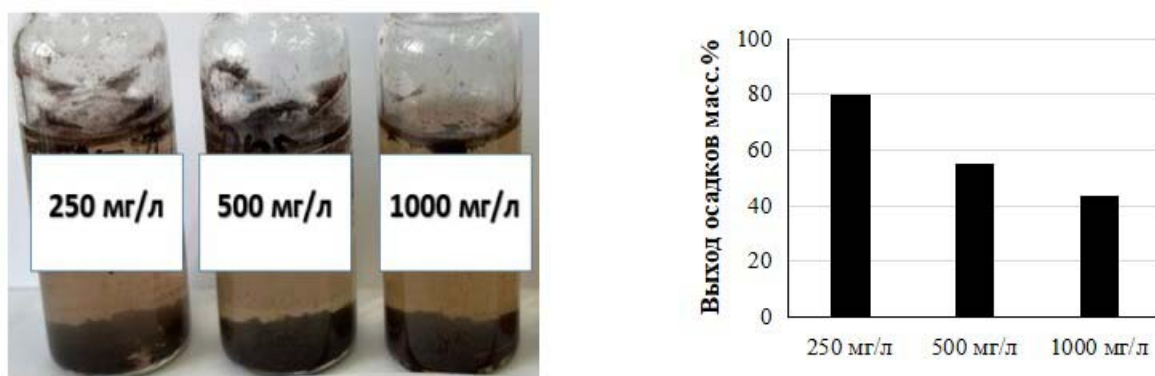


Рис. 7. Осадки продуктов реакции трансформации фенола (250–500–1000 мг/л) препаратами лакказы гриба *F. fomentarius* F-1531

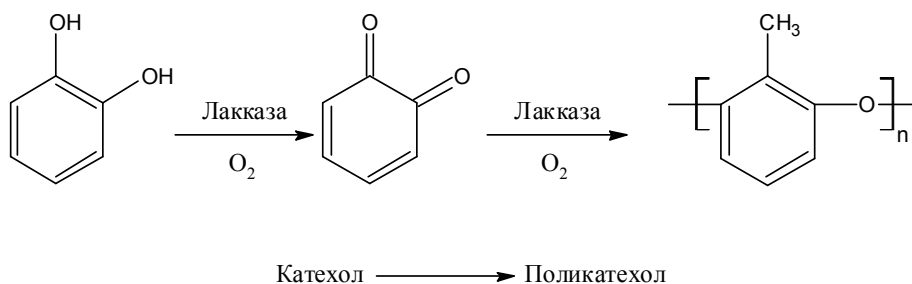


Рис. 8. Схема вероятного механизма образования полифенолов под действием лакказы⁶

Таблица 1

Растворимость* осадка, образующегося при окислении фенола

Растворитель	Описание состояния	Оценка (баллы 1-4)
Вода	Не растворяется	0
Хлороформ	Слабо растворяется	1
Четыреххлористый углерод	Плохо растворяется	1
Бензол	Средняя растворимость	2
Этилацетат	Средняя растворимость	2
Ацетон	Хорошо растворяется, раствор фиолетово-коричневатой окраски	4
Спирт этиловый	Хорошо растворяется, раствор коричневой окраски	4

*Растворение при комнатной температуре

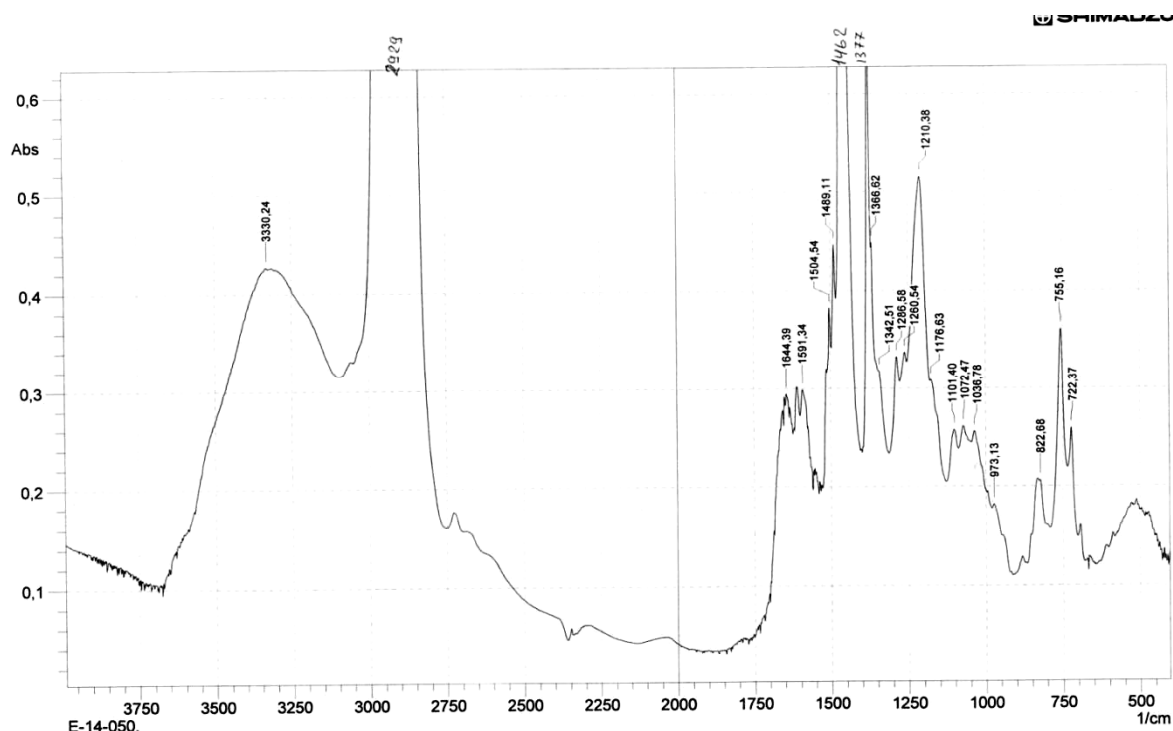


Рис. 9. ИК-спектр фенольного осадка, образовавшегося в результате биodeградации фенола препаратом лакказы гриба *F. fomentarius* F-1531

Таблица 2

Волновые колебания в ИК-спектре продуктов трансформации фенола лакказами гриба *F. fomentarius* F-1531

Область колебаний	Волновые колебания осадка продукта окисления фенола, полученного в реакции с лакказой <i>F. fomentarius</i> F-1531	Описание функциональной группы соединений, соответствующей области колебаний
3700-3300 см^{-1}	3330.24 см^{-1}	Внутри- и межмолекулярные водородные связи в димерах и полимерах
2926 и 2872 см^{-1} (Пики)	2929 см^{-1}	Колебания метильной группы
1400-1300 см^{-1} и около 700 см^{-1}	1377 см^{-1} и 1462 см^{-1}	Деформационные колебания C-H-связей.
3200-2800 см^{-1}	2929 см^{-1}	Слабые (средние) валентные колебания C-H связей в ароматических соединениях
1608-1400 см^{-1}	1462 см^{-1}	Валентные колебания ароматического кольца в аренах и кислоты с H- связями
1295-1005 см^{-1}	1210.38 см^{-1}	Плоскостные деформационные колебания C-H связей 1,2-, 1,4- и 1,2,4-замещенных
1000-630 см^{-1}	755.16 см^{-1}	Внеплоскостные деформационные колебания C-H связей в аренах, колебания гидроксильной группы и C-O связей в карбоновых кислотах

В табл. 2 представлены значения частот ИК-спектров осадков – продуктов ферментативного окисления фенола, которые коррелируют с результатами анализа смолообразных продуктов радиофизического окисления фенола ²¹.

Анализ ИК-спектров исследуемого осадка и продуктов радиолитиза фенола указывает на совпадение регистрируемых полос поглощения/колебания в области 3330.24 см^{-1} , свидетельствующих о наличии внутри- и межмолекулярных водородных связей в молекулах, характерных для полимерной структуры изучаемых веществ. Таким образом, на основании ИК-структурного анализа полимерная природа осадка кажется вероятной.

Дополнительным подтверждением полимерной структуры осадка является обнаружение методом хромато-масспектрометрии в составе промежуточных продуктов трансформации фенола пирокатехина, который обнаруживался также при окислении фенола (250–500–1000 мг/л) очищенным препаратом лакказы (1072 $\pm$ 3 ед/мл) в начальный момент времени, начиная с 10–15 мин реакции.

Таким образом, для интенсификации синтеза препаратов высокоэффективных лакказ гриба *F. fomentarius* F-1531 найдены оптимальные условия культивирования на модифицированной среде ГПС в присутствии экстракта опилок и начальном

pH 5.0 с получением препаратов лакказы 10–12 ед/мл. При этом препараты культуральной жидкости окисляли фенол в концентрации до 1000 мг/л с выведением 60–80 % фенола в виде осадка полимерной природы, основным мономерным компонентом которого являлся пирокатехин, обнаруживаемый методом хромато-масс-анализа. Достаточно сильное ингибирование ферментов (до 50–60 %) в течение 1 ч при повышенных (более 250 мг/л) концентрациях фенола требует разработки методов иммобилизации ферментов с целью снижения ингибирующего действия и возможности повторного использования.

Экспериментальная часть

Гриб *F. fomentarius* F-1531 выращивали на модифицированной глюкозо-пептонной среде (ГПС) следующего состава, г/л: глюкоза – 20; пептон – 3; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 1; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.25; $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2.

Культивирование гриба *F. fomentarius* Э-14 при исследовании синтеза фенолоксидазных ферментов осуществляли при температуре 22 ± 1 °C при перемешивании на качалке (120 об/мин) в течение 10–14 сут.

В качестве инокулята использовали восьми-суточную культуру гриба, полученную культивированием на поверхности сусло-агара (6 °Б). Инокулят вносили в жидкую питательную среду в виде двух агаровых блоков размером 1×1 см.

Лакказную активность (ед/мл) определяли спектрофотометрически по скорости окисления 10 мМ пирокатехина (ϵ 740 мМ/см⁻¹) в 0.1 М ацетатном буфере при оптимальном pH. Измерение оптической плотности реакционной смеси осуществляли при длине волны 410 нм на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия). За единицу активности принимали количество ферментов, катализирующих окисление 1 мкмоль субстрата в течение 1 мин в оптимальных условиях²⁰.

Концентрацию белка в культуральной жидкости определяли по методу Бредфорда²⁰.

Оптимизацию продукции лакказы гриба *F. fomentarius* F-1531 по отношению к начальному pH среды проводили в условиях роста на глюкозо-пептонной среде (ГПС) в течение 8 сут. Значения начальных pH питательной среды варьировали в пределах 3.5–6.0 с шагом 0.5. Заданные значения начального показателя pH питательной среды доводили с помощью стерильных растворов 0.5% -ной H_2SO_4 .

Для исследования биodeградации фенола (0.25–0.5–1.0 г/л) использовали препараты 14-ти суточных культуральных жидкостей гриба с исходной активностью 10 ед/мл, полученные на модифицированной среде ГПС в присутствии экстракта опилок в условиях жидкофазного роста при перемешивании.

Для анализа концентрации фенола использовали следующие методы: спектрофотометрический в УФ-области (286 нм) и метод по Фолину-Чокалтеу⁶.

Осушенный и промытый водой осадок продуктов окисления фенола анализировали методом ИК-Фурье-спектроскопии в лаборатории физико-химических методов анализа ИОХ УНЦ РАН на спектрофотометре IR-Prestige-21 Shimadzu в вазелиновом масле в диапазоне волн 4000–400 см⁻¹.

Промежуточные растворимые продукты окисления фенола анализировали в супернатантах (10 тыс об/мин) реакционной смеси каждые 10–15 мин в течение 60 мин методом хромато-масс спектрометрии на приборе Shimadzu GCMS-QP2010S (электронная ионизация при 70 Эв, диапазон детектируемых масс 33–500 Да): капиллярная колонка HP-1MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), температура испарителя 300 °C, температура испарителя 200 °C; режим программирования температуры: от 500 до 300 °C со скоростью 10 °C/мин, затем при 300 °C в течение 5 мин, газ-носитель – гелий с расходом 1.1 мл/мин.

Литература

1. Shraddha, Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications // *Enzyme Res.* – 2011. – Pp.1-11.
2. Arregui L., Ayala M., Gomez-Gil X. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation // *Microb. Cell. Fact.* – 2019. – V.13, №4. – Pp.169-216.
3. Debnath R., Saha T. An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* – 2020. – V.26. – Pp.1-19.
4. Шутова В.В., Ревин В.В., Мякушина Ю.А. Влияние ионов меди на синтез лакказы грибом *Lentinus*

References

1. Shraddha, Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A. [Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications]. *Enzyme Res.*, 2011, pp.1-11.
2. Arregui L., Ayala M., Gomez-Gil X. [Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation]. *Microb. Cell. Fact.*, 2019, vol.13, no.4, pp.169-216.
3. Debnath R., Saha T. [An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, vol.26, pp.1-19.
4. Shutova V.V., Revin V.V., Miakushina Yu.A. *Vliyanie ionov medi na sintez lakkazy griбом Lentinus (Panus)*

- (*Panus*) *tigrinus* // Прикл. биохимия и микробиология. – 2008. – Т.44, №6. – С.683-687.
5. Mo D., Zeng G., Yuan X. et al. Molecular docking simulation on the interactions of laccase from *Trametes versicolor* with nonylphenol and octylphenol isomers // *Bioprocess Biosyst Eng.* – 2018. – V.41. – Pp.331-343.
 6. Rostami A., Abdelrasoul A., Shokri Z. Applications and mechanisms of free and immobilized laccase in detoxification of phenolic compounds – A review // *Korean J. Chem. Eng.* – 2022. – V.39, №4. – Pp.821-832.
 7. Mikolasch A., Schauer F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – V.82. – Pp.605-624.
 8. Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties // *FEMS Microbiol Rev.* – 2006. – V.30. – Pp.215-242.
 9. Шараева А. А., Халимова Л.Х., Петухова Н. И., Шакиров И. Г., Зорин В. В. Влияние глицерина на рост и окислительную активность трутового гриба – продуцента внеклеточных оксидоредуктаз // *Баш. хим. ж.* – 2014. – Т.21, №3. – С.17-20.
 10. Шакирова А.А., Коваленко С.В., Халимова Л.Х. Исследование влияния препаратов изопропиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот на рост и фенолоксидазную активность гриба *Fomes fomentarius* Э-14 // *Баш. хим. ж.* – 2019. – Т. 26, №1. – С.85-90.
 11. Киселева С.В., Латыпова З.Ю., Аккулова З.Р., Халимова Л.Х. Исследование влияния ионов меди на рост и синтез лакказ гриба *Fomes fomentarius* Э-14 // *Матер. межд. научн.-техн. конф. «Актуальные проблемы науки и техники-2020».* – Уфа: изд-во УГНТУ, 2020. – Т. 2. – С.215-216.
 12. Ponomareva E. G., Kupryashina M. A., Vetchinkina E. P., Nikitina V. E. Extracellular Laccase Activity of Bacteria of the *Genera Azospirillum* and *Niveispirillum* // *Biology bulletin.* – 2019. – V.46, №2. – Pp.161-167.
 13. Sadhasivam S., Savitha S., Swaminathan K., Lin F.-H. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1 // *Process Biochemistry.* – 2008. – V.43, №7. – Pp.736-742.
 14. Barbora Legerska, Daniela Chmelova, Miroslav Ondrejovic. Decolourization and detoxification of monoazo dyes by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor* // *Journal of Biotechnology.* – 2018. – V.285. – Pp.84-90.
 15. Zheng F., An Q., Meng G., Wu X.-J., Dai Y.-C., Si J., Cui B.-K. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2017. – V.102. – Pp.758-770.
 16. Li S., Tang B., Liu Y., Chen A., Tang W., Wei S. High-level production and characterization of laccase from a newly isolated fungus *Trametes* sp. LS-10C // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* – 2016. – V.8. – Pp.278-285.
 17. Neifar M., Jaouani A., Ellouze-Ghorbel R., Ellouze-Chaabouni S., Penninckx M. J. Effect of culturing processes and copper addition on laccase production by the white-rot fungus *Fomes fomentarius* MUCCL 35117 // *Lett Appl Microbiol.* – 2009. – V.49, №1. – Pp.73-78.
 - tigrinus* [Effect of copper ions on the synthesis of laccase by the fungus *Lentinus (Panus) tigrinus*]. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied biochemistry and microbiology], 2008, vol.44, no.6, pp.683-687.
 5. Mo D., Zeng G., Yuan X. et al. [Molecular docking simulation on the interactions of laccase from *Trametes versicolor* with nonylphenol and octylphenol isomers]. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 2018, vol.41, pp.331-343.
 6. Rostami A., Abdelrasoul A., Shokri Z. [Applications and mechanisms of free and immobilized laccase in detoxification of phenolic compounds - A review]. *Korean J. Chem. Eng.*, 2022, vol.39, no.4, pp.821-832.
 7. Mikolasch A., Schauer F. [Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, vol.82, pp.605-624.
 8. Baldrian P. [Fungal laccases-occurrence and properties]. *FEMS Microbiol Rev.*, 2006, vol.30, pp.215-242.
 9. Sharaeva A.A., Khalimova L.Kh., Petukhova N. I., Shakirov I.G., Zorin V.V. *Vliyanie glitserina na rost i oksislitel'nyy u aktivnost' trutovogo griba – produtsenta vnekletochnykh oksidoreduktaz* [Effect of glycerol on growth and oxidative activity of polypore fungus – extracellular oxidoreductases producer]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir chemical journal], 2014, vol.21, no.3, pp.17-20.
 10. Shakirova A.A., Kovalenko S.V., Khalimova L.Kh. *Issledovanie vliyaniya izopropilovykh efirov na rost i fenoloksidaznuyu aktivnost' griba Fomes fomentarius E-14* [Research of influence of the polyunsaturated fatty acids isopropyl esters on the growth and phenoloxidase activity of fungus *Fomes fomentarius* E-14]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir chemical journal], 2019, vol.26, no.1, pp.85-90.
 11. Kiseleva S.V., Latypova G.Yu., Akkulova Z.R., Khalimova L.Kh. *Issledovanie vliyaniya ionov medi na rost i fenoloksidaznuyu aktivnost' griba Fomes fomentarius E-14* [Study of the effect of copper ions on the growth and synthesis of laccases of the fungus *Fomes fomentarius* E-14]. *Mater. mezhd. nauchn.-tehn. konf. «Aktual'nye problemy nauki i tekhniki-2020»* [Materials of the international scientific and technical conference «Actual problems of science and technology»]. Ufa, USPTU Publ., 2020, vol.2, pp.215-216.
 12. Ponomareva E. G., Kupryashina M. A., Vetchinkina E. P., Nikitina V. E. [Extracellular Laccase Activity of Bacteria of the *Genera Azospirillum* and *Niveispirillum*]. *Biology bulletin*, 2019, vol.46, no.2, pp.162-168.
 13. Sadhasivam S., Savitha S., Swaminathan K., Lin F.-H. [Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1]. *Process Biochemistry*, 2008, vol.43, no.7, pp.736-742.
 14. Barbora Legerska, Daniela Chmelova, Miroslav Ondrejovic, [Decolourization and detoxification of monoazo dyes by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*]. *Journal of Biotechnology*, 2018, vol.285, pp. 84-90.
 15. Zheng F., An Q., Meng G., Wu X.-J., Dai Y.-C., Si J., Cui B.-K. [A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, vol.102, pp.758-770.
 16. Li S., Tang B., Liu Y., Chen A., Tang W., Wei S. [High-level production and characterization of laccase from a

18. Hadibarata T., Yuniarto A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by high-laccase basidiomycetes fungi isolated from tropical forest of Borneo // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.– 2020.– V.28.– Pp.101 -117.
19. T. Vetrovsky, P. Baldrian, J. Gabriel Extracellular Enzymes of the White-Rot Fungus *Fomes fomentarius* and Purification of 1,4- β -Glucosidase//*Applied Biochemistry and Biotechnology*.– 2013.– V.169, №1.– Pp.100-109.
20. Kiseleva S. V., Cherepanova E. A., Nasibullina E. R., Khalimova L. Kh., Maksimov I. V. A novel laccase from basidiomycete *Fomes fomentarius* VKPM F-1531// *Intelligent Biotechnologies of Natural and Synthetic Biologically Active Substances*.– 2022.– V.408.– Pp.99-105.
21. Кулиева У.А., Курбанов М.А., Гаджиева Н.Н., Меликова С.З. Фурье ИК-спектроскопическое исследование твердого осадка радиационно-химического превращения фенолов в водных растворах // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*.– 2015.– Т.12.– С.247-252.
17. Neifar M., Jaouani A., Ellouze-Ghorbel R., Ellouze-Chaabouni S., Penninckx M. J. [Effect of culturing processes and copper addition on laccase production by the white-rot fungus *Fomes fomentarius* MUCL 35117]. *Lett Appl Microbiol.*, 2009, vol. 49, no.1, pp.73-78.
18. Hadibarata T., Yuniarto A. [Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by high-laccase basidiomycetes fungi isolated from tropical forest of Borneo]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, vol.28, pp. 101 -117.
19. Vetrovsky T., Baldrian P., Gabriel J. [Extracellular Enzymes of the White-Rot Fungus *Fomes fomentarius* and Purification of 1,4- β -Glucosidase]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, vol.169, no.1, pp.100-109.
20. Kiseleva S. V., Cherepanova E. A., Nasibullina E. R., Khalimova L. Kh., Maksimov I. V. [A novel laccase from basidiomycete *Fomes fomentarius* VKPM F-1531]. *Intelligent Biotechnologies of Natural and Synthetic Biologically Active Substances*, 2022, vol.408, pp.99-105.
21. Kulieva U.A., Kurbanov M.A., Gadzhieva N.N., Melikova S.Z. *Fur'e ik-spektroskopicheskoe issledovanie tverdogo osadka radiatsionno-khimicheskogo prevrashcheniya fenolov v vodnykh rastvorakh* [Fourier IR spectroscopic study of a solid precipitate of the radiation-chemical transformation of phenols in aqueous solutions]. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy* [International Journal of Applied and Fundamental Research], 2015, vol.12. pp.247-252.