

CHARAKTERYSTYKA I KIERUNKI WYKORZYSTANIA ENZYMÓW Z GRUPY WIELOMIEDZIOWYCH OKSYDAZ

Aleksandra Góralczyk-Bińkowska*, Anna Jasińska, Jerzy Długoński

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano w listopadzie 2018 r.

Streszczenie: Wielomiedziowe oksydazy (MCO) stanowią dużą rodzinę niebieskich białek, a ich centrum katalityczne składa się z trzech domen: typu I Cu, typu II Cu oraz pary typu III Cu. Wśród MCO wyróżnia się lakazy, ferrokzydazy, oksydazy askorbinianowe, oksydazy bilirubinowe oraz lakazopodobne wielomiedziowe oksydazy. Wielomiedziowe oksydazy katalizują reakcje utleniania aromatycznych jak i niearomatycznych związków z jednoczesną redukcją tlenu cząsteczkowego do wody. Właściwości te czynią je cennym narzędziem w wielu gałęziach przemysłu i ochronie środowiska.

1. Wprowadzenie. 2. Wielomiedziowe oksydazy – klasyfikacja, struktura i właściwości. 3. Metody identyfikacji enzymów z rodziny MCO. 4. Lakazy vs. inne MCO. 5. Zastosowanie wielomiedziowych oksydaz. 6. Podsumowanie

CHARACTERISTICS AND USE OF MULTICOPPER OXIDASES ENZYMES

Abstract: The multicopper oxidases (MCOs) are a large family of blue copper proteins which contain from one to six copper atom per molecule. Their catalytic center consist of three domains which involve type I Cu, type II Cu and pair of type III Cu's. They include laccases, ferroxidases, ascorbate oxidase, bilirubin oxidase, laccase-like multicopper oxidases. MCOs are capable of one-electron oxidizing aromatic as well as non-aromatic compounds with concomitant four electron reduction of molecular oxygen to water. These properties make them a valuable tool in various industries (e.g. food, textile, pharmaceutical) medicine or environment protection.

1. Introduction. 2. Multicopper oxidases – classification, structure and properties. 3. Identification methods of MCOs. 4. Laccases vs. others MCOs. 5. Application of multicopper oxidases. 6. Summary

Słowa kluczowe: drobnoustroje, lakazy, wielomiedziowe oksydazy
Key words: microorganisms, laccases, multicopper oxidases

1. Wstęp

Wielomiedziowe oksydazy (Multicopper Oxidases, MCO) to rodzina enzymów katalizujących reakcje utleniania substratu z jednoczesną redukcją tlenu cząsteczkowego do wody. Za te reakcje odpowiada uniwersalne dla wszystkich MCO centrum katalityczne, w którego skład wchodzi 4 lub więcej atomów miedzi tworzących typy T1, T2 i dwuatomowy T3. Chociaż budowa centrum katalitycznego większości enzymów zaliczanych do MCO jest zbliżona, ich funkcje biologiczne oraz właściwości katalityczne mogą być zupełnie odmienne.

Jak dotąd poznano (wg bazy UniProt) ok. 50 tys. różnych enzymów charakteryzujących się obecnością typowego dla MCO centrum katalitycznego i zdolnością do utleniania związków organicznych i nieorganicznych. Wielu badaczy starało się przeanalizować cechy na podstawie, których możliwe jest odpowiednie zaklasyfikowanie nowo zidentyfikowanego enzymu o właściwościach MCO. Jednak ze względu na bardzo zbliżone właściwości wobec większości substratów oraz dużą

homologię sekwencji aminokwasowych (zwłaszcza w obrębie centrum katalitycznego) dla większości MCO problem ten nadal wydaje się być nierozwiązany. Do najczęściej opisywanych MCO należą lakazy (zwłaszcza pochodzące z grzybów zaliczanych do gromady *Basidiomycota*), oraz tzw. enzymy lakazopodobne (Laccase-like Multicopper Oxidases, LMCO), oksydaza askorbinianowa (opisywane głównie u roślin wyższych), oksydaza bilirubinowa (np. u *Myrothecium verrucaria*), niektóre pigmenty grzybowe i ferrokzydazy (np. Fet3p drożdży *Saccharomyces cerevisiae*) [12, 26, 44].

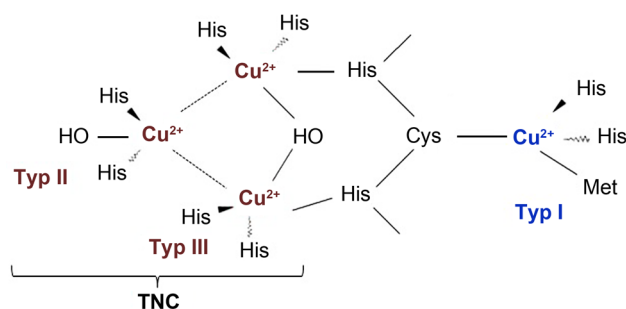
Bardzo wysoki potencjał utleniająco-redukujący MCO oraz różnorodność katalizowanych przez nie reakcji sprawiły, że enzymy te cieszą się dużym zainteresowaniem badaczy na całym świecie i wykazują wiele możliwości aplikacyjnych. MCO są enzymami stosunkowo stabilnymi, łatwymi do wydzielenia z hodowli oraz oczyszczenia, co w połączeniu z ich niską specyficznością substratową czyni je cennym narzędziem w procesach produkcji leków [5], eliminacji związków fenolowych z wyrobów alkoholowych [13],

* Autor korespondencyjny: mgr Aleksandra Góralczyk-Bińkowska, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź; +48 426 354 717; e-mail: aleksandra.goralczyk@biol.uni.lodz.pl

syntezy barwników [19], degradacji i odbarwiania pulpy drzewnej [93] lub detoksykacji ksenobiotyków [40]. Uwagę zarówno środowiska naukowego, jak i przemysłu, skupiły na sobie głównie lakazy oraz enzymy lakazo-podobne [40, 93, 94]. Niewiele uwagi poświęcono jak dotąd innym grupom enzymów z rodziny MCO, które, mimo że są stosunkowo słabiej rozpowszechnione w środowisku naturalnym, stanowią równie interesujący obiekt badań oraz charakteryzują się możliwością zastosowania w praktyce.

2. Wielomiedziowe oksydazy – klasyfikacja, struktura i właściwości

Cechą wspólną wszystkich enzymów zaliczanych do rodziny MCO jest obecność centrum katalitycznego zbudowanego z co najmniej czterech atomów miedzi podzielonych, z uwagi na ich spektroskopowe i magnetyczne właściwości, na trzy typy: typy T1 i T2 – zawierające po jednym atomie miedzi oraz dwuatomowy typ T3 [67]. Typ T1 nadaje cząsteczce enzymu niebieskie zabarwienie i wykazuje intensywną absorpcję światła przy długości fali 610 nm wynikającą z kowalencyjnego wiązania miedź-cysteina. Z kolei typ T2 jest bezbarwny i podobnie jak typ T1, wykrywalny za pomocą spektroskopii rezonansu elektroparamagnetycznego (EPR). Typ T3 w wyniku antyferromagnetycznego sprzężenia pary atomów miedzi nie wykazuje aktywności w spektroskopii EPR, odznacza się jednak pasmem absorpcji światła przy długości fali 330 nm [9] (Ryc. 1).



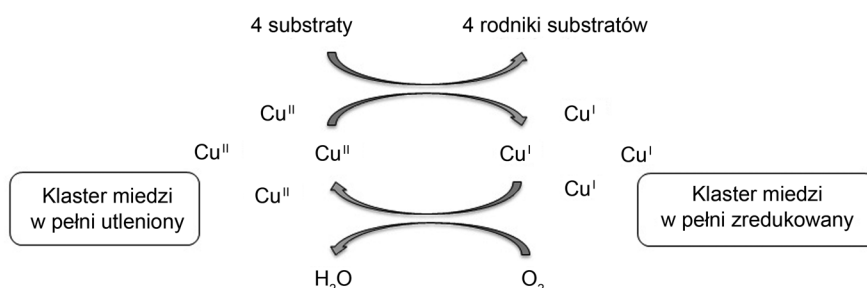
Ryc. 1. Schemat budowy centrum katalitycznego MCO

W centrum T1, gdzie następuje utlenienie substratu, atom miedzi związany jest z dwiema resztami histydyny i jedną cysteiną tworząc zniekształconą strukturę piramidy trygonalnej. Wymieniona sekwencja His-Cys-His, charakterystyczna dla MCO, łączy T1 z T3. Niekiedy może występować w pozycji osiowej, czwarta, słabiej związana reszta aminokwasowa (najczęściej metionina, leucyna lub fenyloalanina), która wpływa na potencjał oksydoredukcyjny enzymu, stabilizuje go oraz reguluje jego aktywność. Położone w bliskim sąsiedztwie atom miedzi typu T2 i dwa atomy typu T3 koordynowane są przez tzw. międzydomenowe miejsca wiązania miedzi, zbudowane odpowiednio z 2 i 6 reszt histydyny i tworzące trójatomowy miedziowy klaster (Trinuclear Cu Cluster, TNC). Stanowi on strukturę unikatową dla rodziny MCO i jest miejscem, w którym następuje wiązanie i czteroelektronowa redukcja tlenu cząsteczkowego do wody [76].

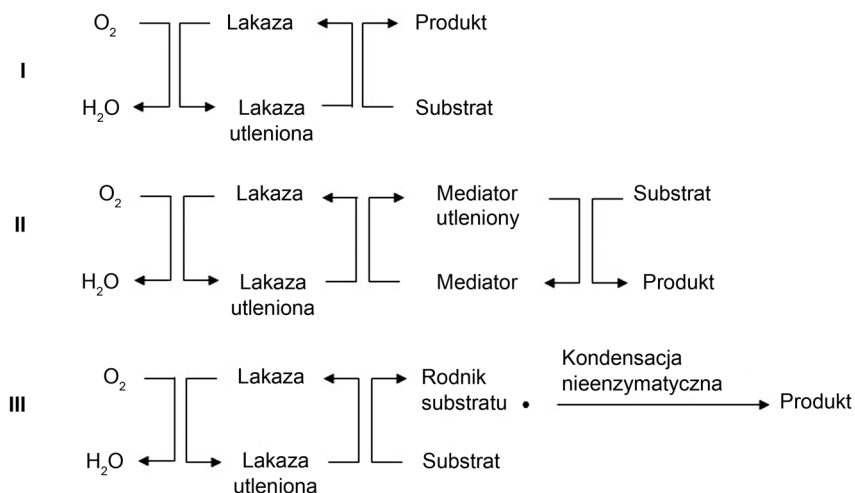
Większość MCO zawiera około 500 reszt aminokwasowych i przyjmuje w swej strukturze drugorzędowej układ harmonijki β (β -sheet) uformowanej w charakterystyczny motyw klucza greckiego (Greek Key) [32, 43]. Z reguły cząsteczka MCO składa się z trzech domen uformowanych ten sposób. Centrum miedzi T1 znajduje się w domenie 3 (blue copper-binding domain), a trójatomowy klaster miedziowy T2/T3 znajduje się na styku domeny 1 i 3, dalej od powierzchni białka w porównaniu do domeny 3. Jednak oprócz trójdomenowych MCO scharakteryzowano również białka posiadające dwie lub sześć domen [61].

Mechanizm katalityczny MCO obejmuje (1) redukcję miejsca T1 Cu poprzez przyjęcie elektronu z utlenionego substratu, (2) przeniesienie elektronu z miejsca T1 do TNC i (3) redukcję O_2 z wytworzeniem dwóch cząsteczek wody (Ryc. 2).

MCO utleniają szerokie spektrum substratów, takich jak fenol, metoksyfenol, aromatyczne aminy, związki wieloaromatyczne, jony metali [39, 51]. Reakcje katalizowane przez MCO mogą zachodzić bezpośrednio (reakcje utleniania prostych związków fenolowych) lub w obecności związku zw. mediatorem, który pośredniczy w przekazywaniu elektronów z substratu do centrum aktywnego enzymu (Ryc. 3). Jeśli bezpośred-



Ryc. 2. Schemat cyklu katalitycznego lakazy



Ryc. 3. Mechanizmy reakcji katalizowanych przez MCO

I – reakcje zachodzące bezpośrednio, II – reakcje zachodzące w obecności mediatora, III – reakcje sprzęgania.
Na podstawie Polak i Jarosz-Wilkolaka [66], zmodyfikowany.

nie utlenienie substratu fenolowego doprowadzi do powstania jego reaktywnych i niestabilnych rodników, mogą one w procesie nieenzymatycznej, spontanicznej reakcji sprzęgania łączyć się ze sobą tworząc dimery, oligomery lub polimery [66].

MCO stanowią bardzo zróżnicowaną grupę enzymów produkowanych zarówno przez organizmy prokariotyczne, jak i *Eukaryota*, i charakteryzujących się różnymi, nie do końca jeszcze poznanymi funkcjami biologicznymi. Chociaż wszystkie MCO wykazują zdolność do utleniania związków aromatycznych, można wśród nich wyróżnić dwie klasy funkcjonalne [86]. Pierwszą stanowią enzymy, które utleniają substraty organiczne chętniej, niż jony metali. Grupę tę tworzą głównie lakazy i enzymy lakazopodobne. Drugie z kolei utleniają jony metali, takie jak Fe (II), Cu (I) i/lub Mn (II), z wyższą wydajnością w porównaniu z substratami organicznymi. Te ostatnie enzymy są określane jako metalooksydazy, a najbardziej powszechne wśród nich to ludzka ceruloplazmina (Cp) i ferroksozydaza drożdżowa (Fet3p) [53]. Podział MCO nie jest stały i usystematyzowany, ponieważ brakuje jasnych kryteriów klasyfikacji. Na przykład według Hoegger i wsp. [26] wielomiedziowe oksydazy tworzy 10 grup enzymów: lakazy *Basidiomycota*, lakazy *Ascomycota*, lakazy owadów, pigmenty grzybowe MCO, ferroksozydazy grzybowe, roślinne i grzybowe oksydazy askorbinianowe, enzymy roślinne podobne do lakaz, białka odporne na miedź (CopA), oksydazy bilirubiny i białka wydzielania miedzi (CueO) (Tabela I). Z kolei Sirim i wsp. [83] w obrębie rodziny MCO wyróżnili: lakazy, ferroksozydazy, oksydazy askorbinianowe (AO) i oksydazy bilirubinowe (BOD). Po zintegrowaniu danych na temat sekwencji i struktur MCO skonstruowano bazę danych The Laccase Engineering Database (LccED) (<https://lcced.biocatnet.de/>). Obecnie w bazie wyróżniono 16 nadrodzin

MCO, zawierających ponad 14 000 sekwencji aminokwasowych 10 415 różnych białek (Tab. I).

Identyfikacja lakaz spośród wielomiedziowych oksydaz dotychczas pozostaje niejednoznaczna. Reiss i wsp. [71] zaproponowała używanie pojęcia „lakazy” jedynie dla enzymu wydzielonego z soku drzewa *Rhus vernicifera* i wprowadzenie pojęcia „lakazopodobnych wielomiedziowych oksydaz” (LMCO), w celu uwzględnienia potencjalnej odmienności ich funkcji biologicznych i cech biochemicznych. Ponadto Brander i wsp. [6] podaje, iż termin „lakazy” pierwotnie był używany w stosunku do roślinnych wielomiedziowych oksydaz posiadających trzy domeny. Natomiast Ihssen i wsp. [30] zaleca klasyfikowanie jako lakaz jedynie tych MCO, które zostały wyizolowane w obecności urushiolu – nienasyconego alkilokatecholu. Klasyfikacja enzymów z rodziny MCO jest złożona z uwagi na ich szeroką specyficzność substratową, niemniej szczegółowa charakterystyka biochemiczna jest niezbędna w celu uporządkowania proponowanych przez badaczy podziałów. Podział MCO nie jest stały i usystematyzowany, ponieważ brakuje jasnych kryteriów klasyfikacji. Najbardziej odpowiedni wydaje się być podział przyjęty przez Hoegger i wsp. [26], jednak z uwagi na nieco odmiennie właściwości biochemiczne i nie do końca sprecyzowane funkcje biologiczne, uzasadnionym wydaje się być wyróżnienie wśród MCO także grupy enzymów lakazopodobnych LMCO.

3. Metody identyfikacji enzymów z rodziny MCO

Do niedawna identyfikacja enzymów zaliczanych do MCO opierała się głównie na charakterystyce ich cech biochemicznych oraz uzdolnień katalitycznych. Interakcje MCO z substratami można ogólnie podzielić

Tabela I

Klasyfikacja wielomiedziowych oksydaz (MCO) wraz z przykładami organizmów zdolnych do ich produkcji i charakterystyką enzymu

Grupa MCO	Przykład organizmu	Charakterystyka enzymu	Piśmiennictwo
Lakazy <i>Basidomycota</i>	<i>Trametes pubescens</i>	pH 3–4,5; DMP, syryngaldazyna	[21]
MCO <i>Ascomycota</i>	<i>Aspergillus niger</i>	pH 5–6; DMPPDA	[90]
Lakazy owadów	<i>Anopheles gambiae</i>	pH 6; ABTS	[46]
Pigmenty grzybowe MCO	<i>Aspergillus niger</i>	pH 5; DMPPDA	[90]
Grzybowe ferroksydazy (Fet3p)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pH 5; p-fenylenodiamina	[86]
Oksydazy askorbinianowe	<i>Brassica oleracea var. italica</i>	pH 7,0 roztwór kwasu askorbinowego	[80]
Roślinne lakazy	<i>Rhus vernicifera</i>	pH 9; syryngaldazyna	[96]
Oksydazy bilirubinowe	<i>Myrothecium verrucaria</i>	pH 8; syryngaldazyna	[96]
Bakteryjne oksydazy wydzielania miedzi (CueO)	<i>Escherichia coli</i>	pH 6,5; DMP	[72]
Bakteryjne lakazy (CotA)	<i>Bacillus subtilis</i>	T ½ w temp. 80°C 2-4 godziny	[61]
Bakteryjne białka odporne na miedź (CopA)	<i>Pseudomonas syringae</i>	pH 5; DMP	[84]

Klasyfikacja MCO wg Hoegger i wsp. [26]

na dwie kategorie i wyróżnić enzymy o niskiej specyficzności substratowej i enzymy o wysokiej specyficzności. Roślinne i grzybowe lakazy należą do pierwszej kategorii i mogą one utleniać difenole, aminy aryłowe i aminofenole, a ich wartości *K_m* mieszczą się ogólnie w zakresie 1–10 mM. Pozostałe MCO mają znaczny stopień specyficzności substratowej (*K_m* < 1 mM) [85].

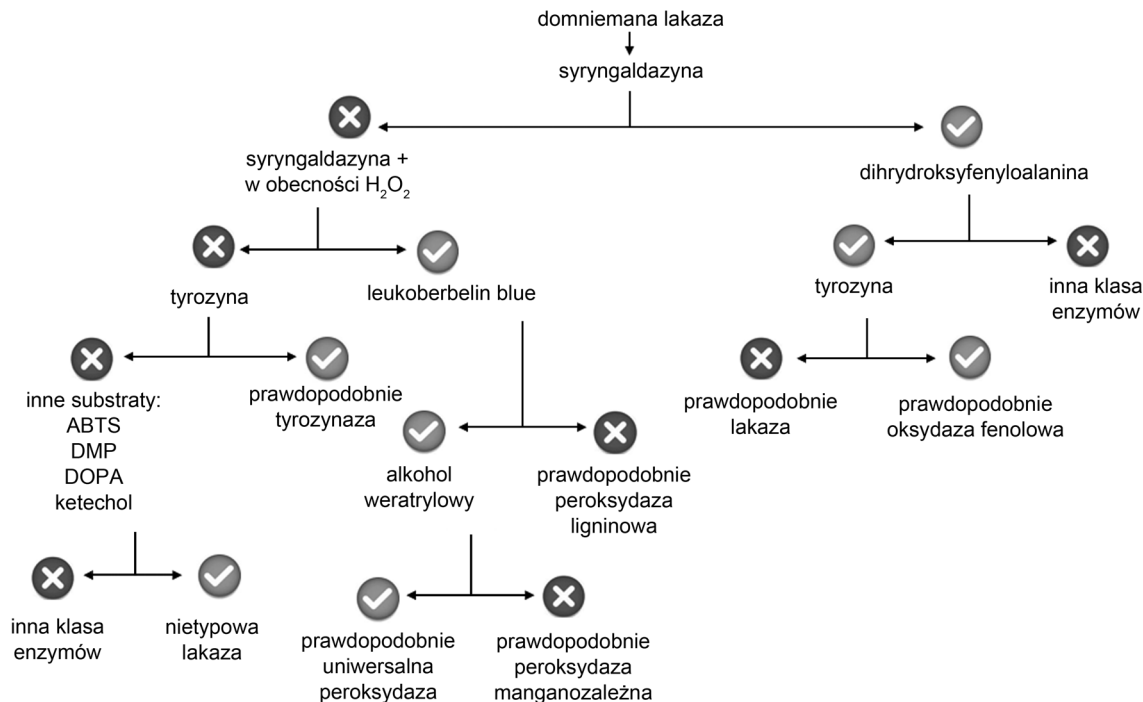
Niektóre substancje takie jak gwajakol, sól diamonowa 2,2'-azyno-bis (3-etylobenzotiazolino-6-kwasu sulfonowego) (ABTS), 2,6-dimetoksyfenol (DMP) i katechol od dawna są określane jako modelowe substraty lakaz [71]. Jednak jak się okazało wiele spośród nich jest również utlenianych przez inne enzymy z grupy MCO np. LMCO lub oksydazy bilirubinowe. Za specyficzny substrat lakazy uznawana była syryngaldazyna [64]. Syryngaldazyna i ABTS mogą być przekształcane przez MnP lub LiP. Jednak zależne od H₂O₂ utlenianie pozwala na rozróżnienie tych enzymów od MCO. MCO można również odróżnić od MnP za pomocą testu z barwnikiem leucoberbelin blue. Związek ten specyficznie reaguje z jonami manganu uwalnianymi przez MnP, co skutkuje pojawieniem się niebieskiego zabarwienia wykazującego maksymalną absorpcję światła przy długości fali 620 nm [18]. Na Rycinie 4 przedstawiono schemat identyfikacji i różnicowania lakaz od innych enzymów ligninolitycznych zaproponowany przez Fernandes i wsp. [18].

O ile zdolność do utleniania specyficznych substratów pozwala szybko ustalić aktywność danego enzymu z grupy MCO, o tyle w dobie rozwoju wysokozaawansowanych technik molekularnych nie powinna ona stanowić jedynej metody identyfikacji i charakterystyki nowopoznanego białka. Rozwój technik omicznych takich jak genomika, transkryptomika i proteomika przyczynił się do ustalenia genów odpowiedzialnych za kodowanie enzymów, badanie ich ekspresji na pozio-

mie transkryptomu i analizę ilościową i jakościową MCO na tle pozostałych białek organizmu. Perry i wsp. [65] jako pierwszy zidentyfikował dwa geny kodujące lakazy *Agaricus bisporus* i stwierdził, że enzymy te mogą występować jako izoformy i być kodowane przez wielogenowe rodziny genów. Od tego czasu setki genów kodujących MCO zidentyfikowano zarówno u grzybów, jak i bakterii. Obecność u jednego szczepu wielu genów kodujących izoformy enzymów może wskazywać na udział tych enzymów w różnych procesach fizjologicznych. Potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt, że poszczególne izoformy enzymów często różnią się specyficznością substratową, a ich aktywność może być odmienna w różnych wariantach pH czy temperatury. Część z nich wykazuje charakter konstytutywny, a część może być indukowana np. związkami aromatycznymi lub jonami miedzi. Techniki genomiczne i proteomiczne pozwoliły na zidentyfikowanie dla MCO sekwencji konsensusowych odróżniających je od innych enzymów. Sekwencje te zawierają cztery (L1, L2, L3, L4) ciągle fragmenty reszt aminokwasowych wiążących miedź, których stopień podobieństwa w zależności od organizmu z jakiego pochodzi enzym może wynosić od 75 do 85%. Regiony L2 i L4 pozwalają na zaklasyfikowanie enzymu do MCO, podczas gdy sekwencje L1 i L3 wskazują na podgrupę enzymu [23].

4. Lakazy vs. inne MCO

Spośród drobnoustrojowych MCO najlepiej zbadaną i opisaną, a zarazem najliczniejszą grupę stanowią lakazy. Są to trójdomenowe MCO po raz pierwszy wyizolowane przez H. Yoshida w 1883 roku z żywicy pochodzącej z drzewa *Rhus vernicifera*. Roślinne lakazy dzięki mechanizmom dehydrogenacji odgrywają ważną



Ryc. 4. Proponowany schemat identyfikacji lakaz od innych enzymów lignino litycznych
Na podstawie Fernandes i wsp. [18], zmodyfikowany.

rolę w polimeryzacji związków fenolowych tworzących ligninę, regeneracji uszkodzonych tkanek i utlenianiu żelaza poprzez przekształcanie Fe (II) do Fe (III) [15]. Pomimo że wg niektórych badaczy termin lakaza powinien być zarezerwowany wyłącznie dla enzymów pozyskiwanych z roślin, również inne trójdomenowe MCO np. pochodzenia drobnoustrojowego, nazywane są lakazami jeśli tylko wykazują zdolność do utleniania związków aromatycznych [61].

Lakazy pochodzenia grzybowego najczęściej występują w postaci kilku monomerów, które oligomeryzują tworząc multimerowe kompleksy. Średnia masa cząsteczkowa monomeru mieści się w zakresie od około 50 do 110 kDa. Ważną cechą lakaz grzybowych jest związana kowalencyjnie grupa węglowodanowa, stanowiąca zwykle od 10 do 45% całej cząsteczki enzymu i składająca się głównie z mannozy, N-acetyloglukozaminy oraz galaktozy. Wszystkie te cechy chronią grzybowe lakazy przed proteolizą, działaniem wysokich temperatur, skrajnie wysokich lub niskich wartości pH i innych niekorzystnych czynników [15, 74].

Spśród grzybów zdolnych do biosyntezy lakaz najlicniejszą grupę stanowią te z gromady *Basidiomycota* np. *Lentinus tigrinus*, *Agaricus bisporus*, *Trametes versicolor* [82]. Wśród nich dość licznie występują tzw. grzyby białej zgnilizny drewna, m.in. szczepy z gatunku *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Cerrena unicolor* [87]. Syntezę tych enzymów opisano również u grzybów należących do gromady *Ascomycota* np. *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Neurospora* sp., *Trichoderma atroviride* i *T. harzianum*

[87]. U grzybów lakazy uczestniczą w procesach morfogenezy, degradacji ligniny oraz reakcjach obronnych na stres. Enzymy te wytwarzane przez saprofityczne oraz mikoryzowe grzyby są zaangażowane w obieg materii organicznej w glebie poprzez degradację polimerów ściółkowych czy tworzenie związków humusowych [26]. Lakazy bakteryjne zidentyfikowano w hodowlach szczepów m.in. *Azospirillum lipoferum*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* oraz kilku gatunków *Streptomyces* [7]. Opisano je również u cyjanobakterii *Anabaena azollae*. Bakteryjne lakazy odznaczają się większą niż enzymy grzybowe aktywnością i stabilnością w wysokich temperaturach, przy alkalicznym pH oraz w obecności wysokich stężeń jonów chloru i miedzi [15].

Reakcjom katalizy, którym pośredniczy lakaza, mogą ulegać zarówno substraty fenolowe, jak i niefenolowe. W przypadku cząsteczek o wysokim potencjale oksydoredukcyjnym oraz cząstek o dużych rozmiarach, które nie są zdolne do samodzielnego przenikania do centrum aktywnego enzymu, niezbędne jest działanie tzw. mediatorów. Są to związki organiczne o małej masie cząsteczkowej, które ulegając utlenianiu przez lakazę, tworzą wysoce aktywne rodniki kationowe zdolne do utleniania związków niefenolowych. Najpowszechniej stosowanymi mediatorami syntetycznymi są ABTS, kwas hydroksyantranilowy (HAA), hydroksybenzotriazol (HBT) i hydroksyftalimid (NPI). Podobne działanie wykazują także mediatory naturalne np. wanilina i syryngaldehid [66].

Lakazopodobne wielomiedziowe oksydazy (LMCO), tak samo jak lakazy, katalizują utlenianie różnych

substratów połączone z redukcją cząsteczki O_2 do dwóch cząsteczek H_2O . Ich funkcje biologiczne są zbliżone do roli lakaz, ale nie wszystkie zostały jeszcze poznane. LMCO zostały opisane u wielu bakterii i grzybów. Średnia masa cząsteczkowa LMCO mieści się przedziale 51–66 kDa, natomiast ilość sekwencji aminokwasowych enzymów wynosi 470–600 aa. Opiszano także LMCO bakterii *Streptomyces*, których masa cząsteczkowa wynosi 32,6 kDa, a długość sekwencji aminokwasów 297 aa. LMCO bakterii Gram-ujemnych różnią się od wszystkich innych LMCO obecnością proliny między dwoma histydynami i dodatkową histydyną w pozycji drugiej po motywie HXH. LMCO pochodzenia bakteryjnego uważa się za bardziej skuteczne w rozkładzie związków organicznych niż LMCO grzybowe. Natomiast LMCO grzybowe mają szersze spektrum substratów niż LMCO z bakterii Gram-ujemnych [49].

Optymalna wartość pH dla działania LMCO nie jest jednakowa, ponieważ zależy od wykorzystanego do jej pomiaru substratu [49]. Na przykład trzy typy LMCO pochodzące z *Aspergillus niger*: McoA, McoB i McoG oczyszczono i scharakteryzowano pod kątem potencjału biokatalitycznego. Wszystkie trzy enzymy były monomerami o masach cząsteczkowych w zakresie od 80 do 110 kDa. Najwyższą aktywność McoA odnotowano w środowisku o pH 5,0, podczas gdy pH 6,0 było optymalne dla McoB i McoG. Ponadto McoA i McoB utleniały DMPPDA (*N,N*-dimetylo-*p*-fenylenodiaminę) w szerszym zakresie pH niż McoG [89]. LMCO wyizolowana *Myrothecium roridum* wykazywała aktywność zarówno MCO, jak i oksydazy bilirubiny [35].

Oksydaza bilirubinowa jest enzymem termostabilnym, zawierającym mostek dwusiarczkowy. BOD katalizuje utlenianie tetrapyrroli np. bilirubiny do biliwerdiny oraz difenoli czy diamin arylowych z jednoczesną redukcją czterech atomów tlenu do wody [10]. Enzym ten został odkryty w nielignilolitycznym grzybie *Myrothecium verrucaria* MT-1 w 1981 roku przez Noriakięgo Tanaka i Sawao Murao. W odróżnieniu do lakaz, BOD charakteryzują się wyższą aktywnością i stabilnością w neutralnym pH oraz w wysokiej temperaturze, jednak nie większej niż 60°C. Odznaczają się również wysoką tolerancją na aniony chlorkowe i inne chelatory [52]. Na przykład oksydaza bilirubinowa wyizolowana z *Myrothecium verrucaria* (MvBOD) wykazała najwyższą aktywność katalityczną w zakresie temperatur 30–60°C i w pH od 7 do 8,5. Natomiast w roztworach o pH powyżej 9 zaobserwowano spadek aktywności katalitycznej BOD aż o 50% [91].

Oksydaza askorbinianowa katalizuje utlenianie askorbinianu do kwasu dehydroaskorbinowego z wytworzeniem H_2O w obecności tlenu. Została wyizolowana z roślin wyższych, u których występuje w największej ilości w ścianie komórkowej i zaangażowana jest w ich wzrost [80, 85]. Poprzez modyfikacje przestrzeni apo-

plastycznej oksydaza askorbinianowa uczestniczy również w reakcjach obronnych [26]. Jej aktywność i ekspresja są indukowane auksyną i światłem, co pozwala przypuszczać, iż uczestniczy ona w transdukcji sygnału [95]. AO opisano również u mikroorganizmów m.in. *Myrothecium verrucaria*, *Aerobacter aerogenes*, *Acremonium* sp. HI-25 [60, 80]. W przeciwieństwie do lakaz, które działają jako monomery, do prawidłowego funkcjonowania AO niezbędne jest utworzenie struktury homodimeru. Taka struktura białka pełni ponadto funkcje stabilizujące [61].

Oksydaza wydzielania miedzi (CueO) występująca w peryplazmie u *E. coli* może utleniać *p*-fenylenodiaminę, 2,6-dimetoksyfenol i podobnie jak niektóre inne trójdomenowe MCO posiada aktywność ferooksydazy. Dzięki temu enzym nie tylko chroni komórkę przed niekorzystnym wpływem jonów miedzi (poprzez utlenianie Cu^+ do mniej szkodliwych Cu^{2+}), lecz także bierze udział w homeostazie żelaza. Wykazano, iż CueO utlenia grupy katecholowe kwasu 2,3-dihydroksybenzoesowego, prekursora enterobaktyny [24]. CueO posiada budowę zbliżoną do lakazy i AO, jednak konformacja TNC różni ją od pozostałych MCO. Dodatkowo w obrębie trzeciej domeny CueO zawiera bogate w metioninę regiony, które działają jak czujnik jonów miedzi, w obecności których znacznie wzrasta aktywność enzymu [61, 72].

Kolejną bakteryjną MCO jest białko wydzielania miedzi (CopA), składające się z trzech domen, opisane u *Pseudomonas syringae* czy *Xanthomonas campestris* [26]. Aktywność tego enzymu określono na podstawie zdolności do utleniania 2,6-dimetoksyfenolu [84]. Jak podaje Nakamura i Go [61] w warunkach tlenowych CopA oraz CueO kontrolują metabolizm miedzi poprzez eksport nadmiaru $Cu(I)$ z cytoplazmy i utlenianie do $Cu(II)$, która jest mniej toksyczna.

Do produkcji termostabilnego białka opłaszczającego endospory – CotA zdolny jest szczep *B. subtilis*. CotA składa się z ponad 30 rodzajów polipeptydów i jest odporne na działanie czynników fizycznych jak i chemicznych. Wynika to funkcji jaką ono pełni, mianowicie wytwarzania melaninowego pigmentu, który chroni przed promieniowaniem UV i nadtlenkiem wodoru [17, 29]. Ponadto białko jest wysoce stabilne, ponieważ okres półtrwania aktywności w temperaturze 80°C ustalono na 2–4 godziny [61]. Jak podaje Rajeswari [69] lakaza CotA wykazuje podobieństwo do CueO u *E. coli* na podstawie budowy centrum katalitycznego, jednakże międzydomenowa pętla posiada miejsca umożliwiające ściślejsze upakowanie, co poprawia stabilność całej struktury oraz zwiększa termostabilność [61]. Jak podaje Enguita i wsp. [16] segment ten zawiera tylko 4 z 46 reszt proliny składających się na cały CotA. Dlatego może to sugerować, iż zawartość proliny, zarówno warunkuje termostabilność białka jak i w połączeniu ze zwiększonym upakowaniem znacznie ją wzmacnia [16].

Pigmenty grzybowe MCO występujące głównie u *Ascomycota* m.in. u *Aspergillus nidulans* [90] odpowiedzialnie są za utlenianie dihydroksyfenylolaniny (DOPA) do dopachinonu podczas szlaku syntezy melaniny. Enzymy te różnią się istotnie od innych MCO w budowie regionu S2 [44]. Utleniają typowe substraty lakaz m.in. p-fenylenodiaminy, pyrogallol, kwas gallusowy czy ABTS [89].

Do MCO zaliczane są również ferrokasydazy, charakteryzujące się powinowactwem do Fe (II), którego nie wykazują pozostałe wielomiedziowe oksydazy. Najczęściej opisywanymi ferrokasydazami są białko błony plazmatycznej u *Saccharomyces cerevisiae* (Fet3p) oraz ludzka ceruplazmina (hCp) składająca się z sześciu domen. Na podstawie rentgenograficznych badań struktury krystalicznej ceruloplazminy ustalono, iż w drugiej, czwartej i szóstej domenie występuje miejsce wiązania miedzi, zaś pierwsza i szósta domena dzielą trójjądrowe międzys Domenowe miejsce wiązania miedzi tworząc pseudosymetryczną strukturę C3 [61]. Cp wykazuje zdolność utleniania aromatycznych diamin i innych związków aromatycznych [85]. Ferrokasydazy odgrywają istotną rolę w homeostazie żelaza u drożdży i ssaków [86]. Fet3p uczestniczy w systemie transportowym Fe (II) o wysokim powinowactwie u drożdży. Początkowo Fe (III) jest zredukowane do Fe (II) przez ferrokasydazę, po czym transportowane jest w komórce. Fet3p pełni rolę ochronną poprzez znoszenie cytotoksycznego działania miedzi i żelaza [26, 85].

Kolejnym przykładem MCO jest SLAC, czyli dwudomenowa wielomiedziowa oksydaza opisana u *Streptomyces coelicolor*, wykazująca zdolność do utleniania aromatycznych i niearomatycznych związków zawierających grupy aminowe i hydroksylowe. Ze względu na podobieństwo sekwencji do lakaz grzybowych, lecz mniejszy rozmiar, enzym ten określono jako mała lakaza. Na podstawie analizy porównawczej sekwencji białkowych ustalono podobieństwo SLAC i innych lakaz w pozycji ligandów metali. Stwierdzono natomiast występowanie 24 reszt histydyny w sekwencji SLAC, co może wskazywać na jej udział w wiązaniu nadwyżki wewnątrzkomórkowych jonów miedzi w celu przeniesienia ich podczas eksportu przez system sekrecyjny TAT [50]. SLAC charakteryzuje się opornością na związki redukujące oraz stabilnością termiczną. Ponadto enzym ten wykazuje najwyższą aktywność w środowisku o pH 9 [11, 50]. Dzięki tym cechom SLAC znalazły zastosowanie w przemyśle celulozowo-papierniczym do odbarwiania barwników [11].

5. Zastosowanie wielomiedziowych oksydaz

Z uwagi na zdolność utleniania wielu substratów, zewnątrzkomórkowy charakter i dosyć wysoką stabilność w szerokim zakresie pH i temperatury enzymy

z grupy MCO odznaczają się wysokim potencjałem aplikacyjnym. Enzymy z tej grupy znalazły jak dotąd zastosowanie w ochronie środowiska, medycynie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz w przemyśle spożywczym. Głównie lakazy i enzymy lakazopodobne, które są najbardziej rozpowszechnioną i scharakteryzowaną grupą MCO, wykorzystywane są jako biokatalizatory reakcji syntezy nowych związków, detekcji, biotransformacji i biodegradacji toksycznych zanieczyszczeń (Tabela II).

Enzymy z grupy MCO stosowane są w wielu obszarach przemysłu spożywczego jak piekarnictwo, przetwórstwo warzyw i owoców, winiarstwo i browarnictwo. Przemysł piekarniczy powszechnie wykorzystuje lakazy do poprawy struktury chleba, a także polepszenia smaku i trwałości ciast [73]. Udowodniono jednak, że także inne MCO takie jak oksydaza bilirubinowa mogą być stosowane w celu sieciowania biopolimerów poprawiając właściwości fizykochemiczne produktów spożywczych [98]. Proces ten zwiększa wytrzymałość i stabilność ciasta obniżając zarazem jego lepkość. Efekt ten zaobserwowano zwłaszcza w przypadku korzystania z gorszej jakości mąk [51]. MCO stosuje się np. do sieciowania arabinoksylianów, dzięki czemu utworzona sieć poprzecznych wiązań polimerów wpływa pozytywnie na miękisz i chrupkość pieczywa [40]. Lakazy, zamiast fizycznych adsorbentów jak SO_2 , mogą być wykorzystywane do eliminacji niepożądanych pochodnych fenolowych, powodujących ciemnienie i zmętnienie soków owocowych, piw i win [13, 40]. W ostatnim czasie pojawiły się nowe doniesienia wskazujące możliwe zastosowanie MCO wyizolowanych z hodowli bakterii fermentacji mlekowej m.in. do usuwania amin biogennych z wina i niektórych wytworów kuchni orientальной [2, 8, 25]. Wykorzystanie MCO w przemyśle spożywczym jest dość powszechne. Preparaty dostępne na rynku, takie jak Falouvorstar, Suberace, LACCASE Y120, których działanie opiera się na aktywności lakazy są z powodzeniem stosowane w piwowarstwie, produkcji korków dla przemysłu winiarskiego i polepszaniu walorów kolorystycznych wyrobów spożywczych [40].

Enzymy z grupy MCO stosowane są jako biokatalizatory w reakcjach otrzymywania wielu substancji aktywnych wchodzących w skład chemii gospodarczej, produktów do pielęgnacji ciała oraz leków charakteryzujących się działaniem przeciwdrobnoustrojowym i przeciwutleniającym [79, 93]. Takie działanie wykazuje jod cząsteczkowy (I_2), którego otrzymywanie poprzez utlenienie I^- opisano dla MCO wyizolowanych z hodowli *Alphaproteobacterium* sp. Q-1 i *Roseovarius* sp. A-2 [81, 88]. Silną aktywność przeciwgrzybiczą udowodniono także dla jodowanych związków fenolowych otrzymywanych w reakcji katalizowanej przez lakazę [31, 78]. Lakazy z powodzeniem wykorzystywane są

Tabela II
Wybrane reakcje syntezy, detekcji i biodegradacji katalizowane przez enzymy z grupy MCO

Obszar zastosowań	Enzym, aktywność	Organizm źródłowy	Substrat, katalizowana reakcja	Warunki reakcji, efektywność procesu	Piśmiennictwo
Biodegradacja ksenobiotyków	Wielomiedziowa oksydaza (1,5 U/mL)	<i>Spirulina platensis</i> CFTRI	Reactive Blue 4 (100 mg/L)	96%; 4 godz.	[1]
	Lakaza	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Atrazyna, pentachlorofenol, naproksen, oksybenzon (0,5 mg/L)	60–99%; 24 godz.; Waniłina	[3]
	Oksydaza bilirubinowa	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Remazol Brilliant Blue R (80 mg/L)	95%; 20 min.; ABTS	[14]
	Płyn pochodzący z zawiesiny lakazy (100 U/L)	<i>Pycnoporus sanguineus</i> CS43	Bisfenol A, 4-nonylofenol, tricolosan (10 mg/L)	89–100%; 5 godz.	[22]
	Lakaza (3 U/mL)	<i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03	Sulfametaksazol (0,25 mM)	87%; 22 godz.	[27]
	Lakaza (0,05 U/mL)	<i>T. versicolor</i>	Chloropiryfos, atrazyna, chlorotalonil, pirymetamil (20 mg/L)	90–100%; 24 godz. – 8 dni	[38]
	Oksydaza bilirubinowa	<i>Myrothecium</i> sp. IMERI	Remazol Brilliant Blue R (80 mg/L)	91,5%; 25 min.; ABTS	[48]
	Lakazopodobna wielomiedziowa oksydaza (2 U/mL)	<i>Streptomyces</i> sp. C1	Indigo Carmine, Diamond Black PV	56–84%; 2 godz.; aldehyd syngowy	[49]
	Lakaza (100 U/L)	<i>Pycnoporus sanguineus</i> CS43	2,4-dichlorofenol, β -nonylofenol (10 mg/L)	71–97%; 8 godz.	[75]
	Lakaza immobilizowana (1 U/mL)	<i>Trametes pubescens</i> Cui 7571	Acid Black 172 (50 mg/L)	69%; 48 godz.	[100]
	Lakaza	<i>Trametes versicolor</i>	Kwas 4-metylo-3-hydroksyantranilowy	Synteza aktywny (składnika aktywny); pH 5, immobilizacja w żelu poliakrylamidowym	[63]
	Lakaza	<i>Myceliophthora thermophila</i>	etylo-1,4-hydrochinon, 2,3-dimetylo-1,4-hydrochinon	Synteza antybiotyków β -laktamowych;	[56]
	Lakaza (350 U/mg)	<i>Coriolus hirsutus</i>	Anilina (50 mM)	Polimeryzacja aniliny w obecności sulfonowanego polistyrenu (SPS) jako matrycy w pH 3.5 – 4.4	[42]
	Lakaza	<i>Trametes pubescens</i>	Biosynteza dimerów totarolu	pH 4.5–5, 30°C, 62.6% konwersja totarolu po 24 h	[62]
Reakcje syntezy i polimeryzacji	Lakaza (0,29 U/mL)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Detekcja luteoliny	Immobilizacja z chlorkiem cyjanurowym (CC) w chitozanie	[20]
	Płyn pochodzący z zawiesiny lakazy (31,5 U/mL)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Detekcja adrenaliny i dopaminy	Adsorpcja na węglu aktywnym; pH 7,0	[47]
	Oksydaza bilirubinowa (50 U)	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Detekcja bilirubiny	Immobilizacja na naocząstkach złota, pH 8,4	[41]
	Kompleks dehydrogenazy glutaminianowej i lakazy	<i>Coriolus hirsutus</i>	Detekcja morfiny	Immobilizacja w poli (alkoholu winylowym); pH 6,5	[5]

również jako biokatalizatory w syntezie leków m.in. antybiotyków β -laktamowych i substancji przeciwnowotworowych np. winblastyny lub mitomycyny [45, 56]. Od 2006 roku, kiedy to po raz pierwszy wykazano aktywność antyproliferacyjną lakazy, trwają intensywne badania nad wykorzystaniem tego enzymu jako czynnika przeciwnowotworowego [92]. Zdolność do hamowania podziałów komórek raka piersi, wątroby, jelita grubego i prostaty udowodniono wobec lakaz pochodzących od różnych gatunków podstawczaków [68, 70]. Zastosowanie lakazy wytwarzanej przez *Cerrena unicolor* w leczeniu nowotworów krwi oraz raka szyjki macicy zostało wykazane i objęte ochroną patentową [37, 54]. Enzym dodany w odpowiednim stężeniu charakteryzował się silnie cytotoksycznym działaniem wobec komórek raka szyjki macicy linii SiHa i CaSki, jednocześnie nie wpływając niekorzystnie na komórki fibroblastyczne stanowiące układ odniesienia [59]. Ten sam enzym działał proapoptotycznie na komórki nowotworów krwi linii Jurkat oraz RPMI 8226 [55]. MCO mogą również działać przeciwwirusowo. Lakaza grzyba *Lentinus tigrinus* hamuje aktywność odwrotnej transkryptazy HIV-1, bez której wirus nie jest zdolny transkrybować materiału genetycznego z RNA na DNA [96].

MCO mogą być wykorzystane do celów analitycznych m.in. testów biologicznych, enzymatycznych i immunochemicznych [94]. Lakazę wykorzystuje się do wykrywania obecności morfiny [5]. Z kolei biosensory oparte na oksydazie bilirubinowej (BOD) zaprojektowane w celu dokładnego określenia poziomu bilirubiny, której zbyt wysokie stężenie w ludzkiej surowicy jest śmiertelne, charakteryzują się wysoką czułością i skutecznością [28]. Co więcej oksydaza bilirubinowa i oksydaza askorbinianowa zostały wykorzystane do badań klinicznych, których celem było wyeliminowanie efektu askorbinianu, który niekorzystnie oddziaływał na wątrobę [76]. Aktywność katalityczną MCO, której towarzyszy redukcja tlenu do cząsteczek wody, wykorzystuje się do pozyskania elektronów, czyli siły napędowej bioogniwi [52, 77].

Lakaza w przemyśle kosmetycznym służy do produkcji barwników i może być stosowana w nietoksycznych farbach do włosów zamiast czynnika utleniającego – nadtlenu wodoru [4]. Takie preparaty są wygodniejsze w użyciu i mniej drażniące dla organizmu z uwagi na zastąpienie czynnika utleniającego, który osłabia włosy i niszczy ich strukturę [13]. Co więcej lakazy, poprzez zmniejszenie zawartości melaniny, mogą być wykorzystywane w preparatach rozjaśniających skórę [40].

Biosynteza barwników z wykorzystaniem lakazy stanowi przyjazną dla środowiska alternatywę do chemicznej syntezy barwników tekstylnych i pozwala zredukować koszty procesu. Substancje otrzymane w ten sposób odznaczają się szeroką gamą barw i trwałością porównywalną z barwnikami syntetycznymi [33].

Z drugiej strony enzymy te można wykorzystywać także do odbarwiania tkanin (np. jeansu) lub przekształcania prekursorów barwników do ich aktywnych form, zwiększając wydajność procesu barwienia [66]. Pozwala to na ograniczenie użycia chemicznych wybielaczy i jest szczególnie użyteczne dla tkanin wrażliwych na związki chemiczne [94].

Dzięki zdolności usuwania toksycznych fenoli powstających podczas degradacji ligniny lakazy uczestniczą w reakcjach jej depolimeryzacji [93]. Dodatkowo enzymy te mogą być użyteczne w modyfikacji włókien celulozowych [40]. W celu usprawnienia procesów utleniania niefenolowych związków działanie lakaz wspomagane jest mediatorami np. ABTS, TEMPO, HBT. Jednak największym ograniczeniem pozostaje koszt syntetycznych mediatorów [94].

W procesach bioremediacji skażonych terenów szczególne zastosowanie znalazły lakazy, głównie pochodzenia grzybowego [36]. Enzymy te stosowane są zarówno w formie wolnej, jak i immobilizowanej do eliminacji szerokiego spektrum toksycznych związków takich jak: związki fenolowe, chlorofenole, cykliczne węglowodory aromatyczne, alkeny wchodzących w skład m.in. pestycydów. Enzymy z grupy MCO mogą być również wykorzystywane w unieszkodliwianiu związków zaliczanych do grupy tzw. modulatorów hormonalnych (EDCs), czyli związków niekorzystnie wpływających na działanie układu wewnątrzwydzielniczego ludzi i zwierząt [58]. Badania przeprowadzone przez Garcia-Morales i wsp. [22] wykazały wysoką wydajność biokatalityczną mieszaniny białek (LaCI i LaCII) grzyba *Pycnoporus sanguineus* CS43, którą wykorzystano do biotransformacji EDCs takich jak bisfenol A, 4-nonylofenol, 17- α -etynyloestradiol i triklosan. Szeroko zbadane zostały również możliwości wielu lakaz, enzymów LMCO oraz oksydazy bilirubinowej w dekoloryzacji barwników przemysłowych i eliminacji ich ze ścieków [34, 94]. Na przykład surowy ekstrakt lakaz pochodzący z grzyba *P. nebrodensis* wykazywał efektywną dekoloryzację (82,69%) zieleni malachitowej już po godzinie inkubacji [99].

6. Podsumowanie

Białka MCO to enzymy, zawierające od jednego do sześciu atomów miedzi w cząsteczce. Do grupy wielomiedziowych oksydaz zaliczane są lakazy, ferroksydazy, oksydaza askorbinianowa, oksydaza bilirubinowa, niektóre pigmenty grzybowe o charakterze wielomiedziowych oksydaz oraz tzw. enzymy lakazo-podobne. MCO posiadają zdolność do utleniania zarówno związków organicznych, jak i nieorganicznych. Reakcjom katalizowanym przez MCO towarzyszy redukcja tlenu cząsteczkowego do wody. Właściwości te czynią je

cennym narzędziem w procesach bioremediacji, medycynie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz w przemyśle spożywczym.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w Krakowie przyznanych na podstawie umowy nr UMO-2017/27/N/NZ9/02160.

Piśmiennictwo

- Afreen S., Shamsi T.N., Baig M.A., Ahmad N., Fatima S., Qureshi M.I., Hassan M.I., Fatma T.: A novel multicopper oxidase (laccase) from cyanobacteria: Purification, characterization with potential in the decolorization of anthraquinonic dye. *PLoS One*, **12**, e0175144 (2017)
- Alvarez M.A., Moreno-Arribas M.A.: The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci. Technol.* **39**, 146–155 (2014)
- Ashe B., Nguyen L.N., Hai F.I., Lee D., Van De Merwe J.P., Leusch F.D.L., Price W.E., Nghiem L.D.: Impacts of redoxmediator type on trace organic contaminants degradation by laccase: Degradation efficiency, laccase stability and effluent toxicity. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **113**, 169–176 (2016)
- Bartosiak M., Cieślak A.: Zastosowanie grzybowej lakazy w procesie bioremediacji (w) *Biotechnologia w analizie, ochronie środowiska, medycynie i przemyśle*, red. K. Kropiwiiec, M. Szala, Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, Lublin, 2015, s. 41–52
- Bauer C.G., Kühn A., Gajovic N., Skorobogatko O., Holt P.J., Neil C., 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 J. Anal. Chem.* **364**, 179–183 (1999)
- 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*, **9**, e99402 (2014)
- Brijwani K., Rigdon A., Vadlani P.V.: Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Res.* DOI:10.4061/2010/149748 (2010)
- Callejón S., Sendra R., Ferrer S., Pardo I.: Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 185–198 (2014)
- Chaurasia P.K., Bharati S.L., Singh S.K.: Comparative studies on the blue and yellow laccases. *Res. Plant Stud.* **1**, 32–37 (2013)
- Christenson A., Shleev S., Mano N., Heller A., Gorton L.: Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1634–1641 (2006)
- Cook R., Hannon D., Southard J.N., Majumdar S.: Small laccase from *Streptomyces coelicolor*-an ideal model protein/enzyme for undergraduate laboratory experience. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* DOI:10.1002/bmb.21102 (2017)
- Copete L.S., Chanagá X., Barriuso J., López-Lucendo M.F., Martínez M.J., Camarero S.: Identification and characterization of laccase-type multicopper oxidases involved in dye-decolorization by the fungus *Leptosphaerulina* sp. *BMC Biotechnology*, DOI:10.1186/s12896-015-0192-2 (2015)
- Desai S.S., Nityanand C.: Microbial laccases and their applications: a review. *Asian J. Biotechnol.* **3**, 98–124 (2011)
- Durand F., Gounel S., Kjaergaard CH., Solomon El., Mano N.: Bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae*: an attractive new enzyme for biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 1489–1498 (2012)
- Dwivedi U.N., Singh P., Pandey V.P., Kumar A.: Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **68**, 117–128 (2011)
- 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. *J. Biol. Chem.* **278**, 19416–19425 (2003)
- Fernandes A.J.T.: Insight into the Multicopper Oxidases. Dissertation presented to obtain the PhD degree in Biochemistry at the Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa (2011)
- Fernandes T.A.R., da Silveira W.B., Passos F.M.L., Zucchi T.D.: Laccases from *Actinobacteria* – what we have and what to expect. *Adv. Microbiol.* **4**, 285–296 (2014)
- Forte S., Polak J., Valensina D., Taddei M., Basosi R., Vanhulle S., Jarosz-Wilkolazka A., Pogni R.: Synthesis and structural characterization of a novel phenoxazinone dye by use of a fungal laccase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **63**, 116–120 (2010)
- Franzoi A.C., Vieira I.C., Dupont J., Scheeren C.W., de Oliveira L.F.: Biosensor for luteolin based on silver or gold nanoparticles in ionic liquid and laccase immobilized in chitosan modified with cyanuric chloride. *Analyst.* **134**, 2320–23528 (2009)
- Galhaup C., Goller S., Peterbauer C.K., Strauss J., Haltrich D.: Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, **148**, 2159–2169 (2002)
- García-Morales R., Rodríguez-Delgado M., Gomez-Mariscal K., Orona-Navar C., Hernandez-Luna C., Parra R., Cárdenas-Chávez D., Mählknecht J., Ornelas-Soto N.: Biotransformation of Endocrine-Disrupting Compounds in groundwater: bisphenol A, nonylphenol, ethynylestradiol and triclosan by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43. *Water Air Soil Pollut.* **226**, 251–265 (2015)
- Giardina P., Vincenza Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G.: Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 369–385 (2010)
- Grass G., Thakali K., Klebba P.E., Thieme D., Müller A., Wildner G.F., Rensing Ch.: Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 5826–5833 (2004)
- Guarcello R., De Angelis M., Settanni L., Formiglio S., Gaglio R., Minervini F., Moschetti G., Gobetti M.: Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid bacteria and identification of the enzyme and gene involved in the decrease of biogenic amines. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 6870–6880 (2016)
- Hoegger P.J., Kilaru S., James T.Y., Thacker J.R., Kües U.: Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J.* **273**, 2308–2326 (2006)
- Hofmann U., Schlosser D.: Biochemical and physicochemical processes contributing to the removal of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2381–2399 (2016)
- Hooda V., Gahlaut A., Gothwal A., Hooda V.: Bilirubin enzyme biosensor: potentiality and recent advances towards clinical bioanalysis. *Biotechnol. Lett.* **39**, 1453–1462 (2017)
- Hullo M.F., Moszer I., Danchin A., Verstraete I.M.: CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.* **183**, 5426–5430 (2001)
- Issen 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*. *Sci. Rep.* **12**, 10465 (2015)

31. Ihssen J, Schubert M., Thöny-Meyer L., Richter M.: Laccase catalyzed synthesis of iodinated phenolic compounds with antifungal activity. *PLoS One*, **9**, e89924 (2014)
32. Janusz G., Kucharzyk K.H., Pawlik A., Staszczak M., Paszczynski A.J.: Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* **52**, 1–12 (2013)
33. Jarosz-Wilkolańska A., Polak J., Olszewska A.: Method of obtaining synthetic dyes. Nr patentu PL213247 (B1), Nr zgłoszenia PL385790 (A1), Właściciel: Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Data wydania decyzji 2012-09-25
34. Jasińska A., Góralczyk A., Długoński J.: Dyes decolourisation and degradation by microorganisms (w) *Microbial biodegradation: from omics to function and application*, red. J. Długoński, Caister Academic Press, Norflok, UK, 2016, s. 119–141
35. Jasińska A., Góralczyk A., Soboń A., Długoński J.: Novel laccase-like multicopper oxidases from the *Myrothecium roridum* fungus – production enhancement, identification and application in the dye removal process. *Acta Biochim. Pol.* **65**, 287–295 (2018)
36. Jasińska A., Różalska S., Bernat P., Paraszkiwicz K., Długoński J.: Malachite green decolorization by non-basidiomycete filamentous fungi of *Penicillium pinophilum* and *Myrothecium roridum*. *Int. Biodeter. Biodegr.* **73**, 33–40 (2012)
37. Jaszek M., Matuszewska A., Osińska-Jaroszuk M., Janusz G., Sulej J., Stefaniuk D., Giannopoulos K., Karp.: Laccase enzyme isolated from *Cerrena unicolor* fungus to be applied in treatments of blood neoplastic diseases. Nr patentu PL225934 (B1), Nr zgłoszenia PL406228 (A1), Właściciel: Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Data wydania decyzji 2016-12-16
38. Jin X., Yu X., Zhu G., Zheng Z., Feng F., Zhang Z.: Conditions optimizing and application of laccase-mediator system (LMS) for the laccase-catalyzed pesticide degradation. *Sci. Rep.* **24**, 35787 (2016)
39. Jones S.M., Solomon E.I.: Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 869–883 (2015)
40. Kaczmarek M.B., Kwiatos N., Szczęsna-Antczak M., Bielecki S.: Laccases – enzymes with an unlimited potential. *Biotechnol. Food Sci.* **81**, 41–70 (2017)
41. Kannan P., Chen H., Lee V.T., Kim D.H.: Highly sensitive amperometric detection of bilirubin using enzyme and gold nanoparticles on sol-gel film modified electrode. *Talanta*, **86**, 400–407 (2011)
42. Karamyshev A., Sergey V.S., Koroleva O., Yaropolov A., Sakharov I.Y.: Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 556–564 (2003)
43. Kosman D.J.: Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**, 15–28 (2010)
44. Kües U., Rühl M.: Multiple multi-copper oxidase gene families in *Basidiomycetes* – What for? *Curr. Genomics*, **12**, 72–94 (2011)
45. Kunamneni A., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M.: Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications (w) *communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, red. A. Mendez-Vilas, Formatex, Badajoz, 2007, s. 233–245
46. Lang M., Braun C.L., Kanost M.R., Gorman M.J.: Multicopper oxidase-1 is a ferroxidase essential for iron homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13337–13342 (2012)
47. Leite O.D., Fatibello-Filho O., Barbosa A. de M.: Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*Pleurotus ostreatus*). *J. Braz. Chem. Soc.* **14**, 297–303 (2003)
48. Liu Y., Huang J., Zhang X.: Decolorization and biodegradation of remazol brilliant blue R by bilirubin oxidase. *J. Biosci. Bioeng.* **108**, 496–500 (2009)
49. Lu L., Zeng G., Fan Ch., Ren X., Wang C., Zhao Q., Zhang J., Chen M., Chen A., Jiang M.: Characterization of a laccase-like multicopper oxidase from newly isolated *Streptomyces* sp. C1 in agricultural waste compost and enzymatic decolorization of azo dyes. *Biochem. Eng. J.* **72**, 70–76 (2013)
50. Machczyński M.C., Vijgenboom E., Samyn B., Canters G.W.: Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Sci.* **13**, 2388–2397 (2004)
51. Madhavi V., Lele S.S.: Laccase properties and applications. *Bio-Resources*, **4**, 1694–1717 (2009)
52. Mano N., Edembe L.: Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: features and recent findings. *Biosens. Bioelectron.* **15**, 478–485 (2013)
53. Martins L.O., Paulo Durão P., Brissos V., Lindley P.F.: Laccases of prokaryotic origin: enzymes at the interface of protein science and protein technology. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 911–922 (2015)
54. Matuszewska A., Jaszek M., Janusz G., Osińska-Jaroszuk M., Sulej J., Stefaniuk D., Rogalski J., Mizerska-Dudka M., Kandefer-Szerszeń M.: Laccase enzyme isolated from *Cerrena unicolor* fungus to be applied in the cervical carcinoma treatment. Nr patentu PL225869 (B1), Nr zgłoszenia PL406573 (A1), Właściciel: Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Data wydania decyzji 2016-12-13
55. Matuszewska A., Karp M., Jaszek M., Janusz G., Osińska-Jaroszuk M., Sulej J., Stefaniuk D., Tomczak W., Giannopoulos K.: Laccase purified from *Cerrena unicolor* exerts antitumor activity against leukemic cells. *Oncol. Lett.* **11**, 2009–2018 (2016)
56. Mikolasch A., Hildebrandt O., Schluter R., Hammer E., Witt S., Lindequist U.: Targeted synthesis of novel α -lactam antibiotics by laccase-catalyzed reaction of aromatic substrates selected by pre-testing for their antimicrobial and cytotoxic activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 4885–4899 (2016)
57. Mikolasch A., Wurster M., Lalk M., Witt S., Seefekdt S., Hammer E., Schauer F., Julich W.D., Lindequist U.: Novel β -lactam antibiotics synthesized by amination of catechols using fungal laccase. *Chem Pharm. Bull.* **56**, 902–907 (2008)
58. Minussi R.C., Miranda M.A., Silva J.A., Ferreira C.V., Aoyama H., Marangoni S., Rotilio D., Pastore G.M., Durán N.: Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Afr. J. Biotechnol.* **6**, 1248–1254 (2007)
59. Mizerska-Dudka M., Jaszek M., Błachowicz A., Rejczak T.P., Matuszewska A., Osińska-Jaroszuk M., Stefaniuk D., Janusz G., Sulej J., Kandefer-Szerszeń M.: Fungus *Cerrena unicolor* as an effective source of new antiviral, immunomodulatory, and anticancer compounds. *Int. J. Biol. Macromol.* **79**, 459–568 (2015)
60. Murao S., Itoh H., Yajima T., Ozaki Y., Fukuyasu S., Shin T.: Isolation and purification of ascorbate oxidase from *Acremonium* sp. HI-25. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 847–852 (2014)
61. Nakamura K., Go N.: Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2050–2066 (2005)
62. Ncanana S., Baratto L., Roncaglia L., Riva S., Burton S.G.: Laccase-mediated oxidation of totarol. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1507–1513 (2007)
63. Osiadacz J., Al-Adhami A.J.H., Bajraszewska D., Fischer P., Peczyńska-Czoch W.: 1999. On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. *J. Biotechnol.* **72**, 141–149 (1999)
64. Perna A., Agger J.W., Holck J., Meyer A.S.: Multiple reaction monitoring for quantitative laccase kinetics by LC-MS. *Scientific Rep.* **8**, 8114 (2018)

65. Perry C.R., Smith M., Britnell C.H., Wood D.A., Thurston C.F.: Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1209–1218 (1993)
66. Polak J., Jarosz-Wilkolazka A.: Reakcje katalizowane przez lakazę – mechanizm i zastosowanie w biotechnologii. *Biotechnologia*, **4**, 82–94 (2007)
67. Potti R.B., Rajasekhar P., Subramanyam K.: Occurrences, physical and biochemical properties of laccase. *U.J.E.R.T.* **2**, 1–13 (2012)
68. Qianqian M., Miao L., Hexiang W.: Purification and characterization of a laccase with antiproliferative activity from *Corioliolus versicolor*. *Acta Edulis Fungi*, **17**, 43–47 (2010)
69. Rajeswari M.: Characterization and optimization of bacterial laccase production and its application in the degradation of selected pollutants, 24.11.2015, <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/handle/10603/93386> (20.10.2018)
70. Rashid S., Unyayar A., Mazmanci MA., McKeown SR., Banat IM., Worthington J. A study of anti-cancer effects of *Funalia trogii* in vitro and in vivo. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 1477–1483 (2011)
71. Reiss R., Ihssen J., Richter M., Eichhorn E., Schilling B., Thöny-Meyer L.: Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *PLoS One*, **8**, e65633 (2013)
72. Roberts S.A., Weichsel A., Grass G., Thakali K., Hazzard J.T., Tollin G., Rensing Ch., Montfort W.R.: Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2766–2771 (2002)
73. Rodriguez-Couto S., Toca-Herrera J.L.: Inhibitors of laccases: a review. *Curr. Enzym. Inhib.* **2**, 343–352 (2006)
74. Rodriguez-Couto S.: Fungal laccase in the textile industry (w) Fungal biomolecules: sources, applications and recent developments, red. V.K. Gupta, R.L. Mach, S. Sreenivasaprasad, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2015, s. 63–72
75. Rodríguez-Delgado M., Orona-Navar C., García-Morales R., Hernandez-Luna C., Parra R., Mahlknecht J., Ornelas-Soto N.: Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwaters by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **108**, 34–41 (2016)
76. Sakurai T., Kataoka K.: Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *Chem. Rec.* **7**, 220–229 (2007)
77. Sané S., Richter K., Rubenwolf S., Matschke N.J., Jolivald C., Madzak C., Zengerle R., Gescher J., Kerzenmacher S.: Using planktonic microorganisms to supply the unpurified multi-copper oxidases laccase and copper efflux oxidases at a biofuel cell cathode. *Bioresour. Technol.* **158**, 231–238 (2014)
78. Schubert M., Ihssen J.: Wood protection against microorganisms by laccase-catalysed iodination. EP2871962A1EP, PCT/CH2013/000088 2013-11-28
79. Senthivelan T., Kanagaraj J., Panda R.C.: Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach – A review. *Biotechnol. Bioproc. E.* **21**, 19–38 (2016)
80. Shimada Y., Ko S.: Ascorbic acid and ascorbic acid oxidase in vegetables. *Chugokugakuen J.* **7**, 7–10 (2008)
81. Shiroyama K., Kawasaki Y., Unno Y., Amachi S.: A putative multicopper oxidase, IoxA, is involved in iodide oxidation by *Roseovarius* sp. strain A-2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 1898–1905 (2015)
82. Shradha, Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A.: Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res.* 217861 (2011)
83. Sirim D., Wagner F., Wang L., Schmid R.D., Pleiss J.: The laccase engineering database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. Database (Oxford) bar006. Published online 2011-04-15 DOI: 10.1093/database/bar006
84. Solano F., Lucas-ElíoP., López-Serrano D., Fernández E., Sanchez-Amat A.: Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 175–181 (2001)
85. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E.: Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563–2605 (1996)
86. Stoj C., Kosman D.J.: Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function. *FEBS Lett.* **554**, 422–426 (2003)
87. Subramanian J., Ramesh T., Kalaiselvam M.: Fungal laccases – properties and applications: A Review. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* **2**, 8–16 (2014)
88. Suzuki M., Eda Y., Ohsawa S., Kanesaki Y., Yoshikawa H., Tanaka K., Muramatsu Y., Yoshikawa J., Sato I., Fujii T., Amachi S.: Iodide oxidation by a novel multicopper oxidase from the *Alphaproteobacterium* Strain Q-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3941–3949 (2012)
89. Tamayo-Ramos J.A., Barends S., de Lange D., de Jel A., Verhaert R., de Graaff L.: Enhanced production of *Aspergillus niger* laccase-like multicopper oxidases through mRNA optimization of the glucoamylase expression system. *Biotechnol. Bioeng.* **2**, 543–551 (2013)
90. Tamayo-Ramos J.A., van Berkel W.J.H., de Graaff L.: Biocatalytic potential of laccase-like multicopper oxidases from *Aspergillus niger*. *Microb. Cell Fact.* **11**, 165–176 (2012)
91. Tasca F., Farias D., Castro C., Acuna-Rougier C., Antiochia R.: Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* physically absorbed on graphite electrodes. Insights into the alternative resting form and the sources of activity loss. *PLoS One*, **10**, e0132181 (2015)
92. Unyayar A., Demirbilek M., Turkoglu M., Celik A., Mazmanci M.A., Erkurt E.A., Unyayar S., Cecik O., Atacag H.: Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of *Corioliolus versicolor* and *Funalia trogii* extracts on mammalian cells. *Drug. Chem. Toxicol.* **29**, 69–83 (2006)
93. Upadhyay P., Shrivastava R., Agrawal P.K.: Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, **6**, 1–12 (2016)
94. Viswanath B., Rajesh B., Janardhan A., Kumar A.P., Narasimha G.: Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Res.* 163242 (2014)
95. Xie N., Ruprich-Robert G., Silar P., Herbert E., Ferrari R., Chapeland-Leclerc F.: Characterization of three multicopper oxidases in the filamentous fungus *Podospora anserina*: A new role of an ABR1-like protein in fungal development? *Fungal Genet. Biol.* **116**, 1–13 (2018)
96. Xu F., Shin W., Brown S.H., Wahleithner J.A., Sundaram U.M., Solomon E.I.: A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim. Biophys. Acta*, **1292**, 303–311 (1996)
97. Xu L.J., Wang H.X., Ng T.B.: A Laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the broth of mycelial culture of the mushroom *Lentinus tigrinus*. *J. Biomed. Biotechnol.* 536725 (2012)
98. Yamaguchi S.: Method for cross-linking protein by using enzyme. No US6420148B2 US Grant 2002-01-24 Inventor
99. Yuan X., Tian G., Zhao Y., Zhao L., Wang H., Ng T.B.: Degradation of dyes using crude extract and a thermostable and pH-stable laccase isolated from *Pleurotus nebrodensis*. *Biosci. Rep.* DOI:10.1042/BSR20160163 (2016)
100. Zheng F., Cui B.-K., Wu X.-J., Meng G., Liu H.-X., Si J.: Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **110**, 69–78 (2016)