

«LACCASE»

(Шифр)

Конкурсна робота
на Всеукраїнський конкурс студентських наукових робіт
Спеціальність: «Хімія»

**НОВА ЛАККАЗНО-МЕДІАТОРНА СИСТЕМА ДЛЯ ДЕКОЛОРИЗАЦІЇ
ТА ДЕТОКСИКАЦІЇ СИНТЕТИЧНИХ БАРВНИКІВ У ВОДІ**

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
1. Огляд літератури.....	5
1.1. Характеристика лакказ та їх функції.....	5
1.2. Структура, субстратна специфічність та каталітичні властивості лакказ.....	6
1.3. Лакказно-медіаторні системи.....	9
1.4. Застосування лакказ.....	11
2. Експериментальна частина.....	13
2.1. Обладнання, реактиви та матеріали.....	13
2.2. Підготовка та приготування реактивів.....	17
2.2.1. Приготування цитратно-фосфатного буферного розчину.....	17
2.2.2. Приготування розчину ферменту лаккази <i>Trametes versicolor</i>	17
2.3. Методи дослідження.....	17
3. Результати та їх обговорення.....	18
3.1. Вплив рН середовища на швидкість знебарвлення індигокарміну..	18
3.2. Визначення активності лаккази <i>Trametes versicolor</i>	18
3.3. Ефективність знебарвлення барвників.....	19
3.4. Механізм окиснення барвників з використанням системи лакказа – ГПД.....	26
3.5. Дослідження фітотоксичності барвників.....	26
ВИСНОВКИ.....	29
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	30

ВСТУП

Актуальність роботи. Дефіцит прісної і питної води є однією з глобальних проблем сьогодення. Її вирішення неможливе без розробки ефективних способів очистки стічних вод, кількість яких невідпинно зростає [1].

Особливо гострою є проблема очищення стічних вод від комплексного впливу і не прогнозованості віддалених наслідків дії органічних сполук на навколишнє середовище. Шкода, якої завдають ці забруднювачі, зокрема водоймам, посилюється за рахунок кумулятивного ефекту (прогресуюче збільшення вмісту шкідливих речовин у кожній наступній ланці трофічного ланцюга). Серед таких забруднювачів окреме місце займають органічні барвники, які широко застосовують у різних виробничих процесах та в побуті [2]. Натуральні і синтетичні барвники - це великий клас сполук, в основному органічних, дуже стабільних і інертних по відношенню до фізичної, хімічної та біологічної деградації. Наявність барвників у воді ускладнює пропускання сонячного світла через воду і зменшує розчинність кисню у водоймах. Більшість ароматичних барвників можуть бути токсичними [3, 4], особливо для водних організмів і рослин.

Для очищення стічних вод текстильного виробництва використовують комплекс фізико-хімічних методів, таких як коагуляція, фільтрація, флотація, електрокоагуляція, опромінення, озонування та інші. Але ці технології є досить дорогими, складними методологічно, а хімічні методи очистки, до того ж, самі приводять здебільшого до утворення нових шкідливих для природи компонентів [5].

У зв'язку з підвищенням вимог щодо екологічної безпеки проведення хімічних процесів у промисловості все більшого застосування набувають біокаталітичні процеси [6]. Біотехнологічні принципи набувають все більшої актуальності внаслідок утворення екологічно безпечних продуктів та економії енергоресурсів. Для цього використовують мікроорганізми або рослини (ферменти з рослин/грибів), які перетворюють різні забруднювачі у менш

токсичні форми [7]. Промислове одержання біокаталізаторів на основі технічних ферментів є економічно вигідним.

У промислових біокаталітичних процесах широко використовуються різні ферменти. Особливий інтерес представляють лаккази [6]. Широка субстратна специфічність цих ферментів та їхня здатність використовувати атмосферний кисень як акцептор електронів, робить лакказу перспективною складовою різних промислових процесів – відбілювання та знебарвлення тканин, делігніфікації пульпи, виготовлення антибіотиків та протиракових препаратів, очистки стічних вод від органічних забруднювачів [8].

Вивчення біокаталітичних альтернативних методів очистки стічних вод від поллютантів на сьогодні сприяє зниженню впливу на навколишнє середовище токсичних речовин [9] і є актуальним, оскільки в Україні, на жаль, ми маємо дуже складну екологічну ситуацію.

Метою дослідження є вивчення ефективності нової лакказно-медіаторної системи лакказа *Trametes versicolor* – 3-(гідроксиіміно)пентан-2,4-діон (ГПД) – кисень повітря для знебарвлення синтетичних барвників.

Об'єкти дослідження: нова лакказно-медіаторна каталітична система лакказа *Trametes versicolor* – 3-(гідроксиіміно)пентан-2,4-діон.

Предметом дослідження є процес окиснення синтетичних барвників киснем повітря з використанням біокаталітичної системи на основі лаккази *Trametes versicolor*.

Апробація результатів дослідження: результати роботи було впроваджено у навчальний процес кафедри біохімії та фізичної хімії, шляхом створення практикуму з дисципліни «Кінетика та термодинаміка ферментативних процесів».

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика лакказ та їх функції

Лаккази (КФ 1.10.3.2, пара-дифенол: кисень оксидоредуктази) містять у своєму каталітичному центрі чотири атоми міді [10]. У залежності від джерела ферменту, субстратна специфічність і каталітична активність лакказ може розрізнятися [11-13]. Вони здатні каталізувати окиснення широкого кола субстратів органічної та неорганічної природи, в результаті якого відбувається чотириелектронне відновлення молекулярного кисню до води [14, 15].

Вперше лакказа була виявлена Yoshida у соці японського лакового дерева *Rhus vernicifera* [16]. Згодом лаккази та лакказоподібні оксидази були знайдені в багатьох рослинах [17, 18] та деяких бактеріях [19, 20], де вони приймають участь у процесах пігментації та патогенезу [21]. Однак більшість описаних до теперішнього часу лакказ були виділені з різних видів грибів [12, 22]. Найбільш вивчені з них є ферменти базидіальних грибів, які викликають білу гниль деревини. До цих грибів відносяться *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Trametes maxima*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus eryngii* та ін. [23].

Лаккази каталізують окиснення різних органічних субстратів з утворенням радикальних продуктів. Наступна за цим процесом реакція окиснювального сполучення відіграє ключову роль у переробці багатьох біологічно важливих сполук: лігнінів, меланінів, алкалоїдів, а також гумінових і дубильних речовин [24]. У зв'язку з цим основними функціями лакказ у живих організмах є формування плодових тіл грибів, участь у патогенезі, а також деградація та біосинтез лігніну [23].

1.2. Структура, субстратна специфічність та каталітичні властивості лакказ

Усі лаккази є глікопротеїнами і, як правило, складаються з одного поліпептидного ланцюга. До теперішнього часу визначена амінокислотна послідовність для деяких грибних і рослинних ферментів. Молекулярна маса лакказ варіює від 40000 до 140000 Да і залежить від частки вуглеводів у складі фермента. Вуглеводна частина відповідає за стабільність ферменту та складає від 10 до 50 % маси білка.

Як і багато інших купрумвмісних білків лаккази мають яскраво-блакитний колір. У нативному стані активний центр лакказ містить чотири іона міді, певним чином координованих з поліпептидним ланцюгом. За своїми оптичними властивостями вони можуть бути розділені на три типи, що називаються T1, T2 і T3 центрами. T1 центр лакказ включає один іон Cu (II) , який характеризується сильним електронним поглинанням в області 600 нм і слабким ЕПР сигналом [25]. T2 центр також включає один іон міді, який не має оптичного поглинання в УФ і видимій областях спектра, однак проявляє парамагнітні властивості і детектується методом ЕПР [26]. До складу T3 центра входять два іона Cu (II) . Цей центр характеризується поглинанням у ближній ультрафіолетовій області ($\lambda = 330$ нм) та відсутністю ЕПР сигналу. Встановлено, що іони міді T2 і T3 центрів утворюють унікальний триядерний кластер, де відбувається відновлення молекулярного кисню до води [27].

Процес каталізу за участю лакказ починається з відновлення іона міді T1 центра, який функціонує як первинний акцептор електронів від субстрата-донора. На наступній стадії електрони від іона міді T1 переносяться на триядерний T2/T3 кластер, після чого на T2/T3 кластері відбувається чотириелектронне відновлення молекулярного кисню, в результаті якого утворюється вода.

До теперішнього часу запропоновано декілька моделей зв'язування та активації O_2 в триядерному мідному кластері. Експериментальні дані

підтверджують схему «асиметричної» активації O_2 , в ході якої молекула кисню спочатку зв'язується з іоном міді T2, а потім з одним із іонів міді T3 центра [28]. Реакція, що протікає за участю лакказ відбувається за механізмом бі-бі пінг-понгу (Рис. 1) через послідовне одноелектронне окиснення чотирьох молекул субстрату до відповідних окиснених форм та супроводжується відновленням молекули кисню до води (Рис. 2) [29].

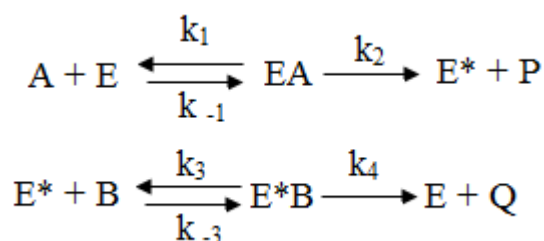


Рис. 1. Схема Келланда для пінг-понг механізму. E – окиснена форма ферменту, E^* – відновлена форма ферменту, A і B – субстрати, що послідовно зв'язуються з каталітичним центром ферменту, P і Q – продукти реакції

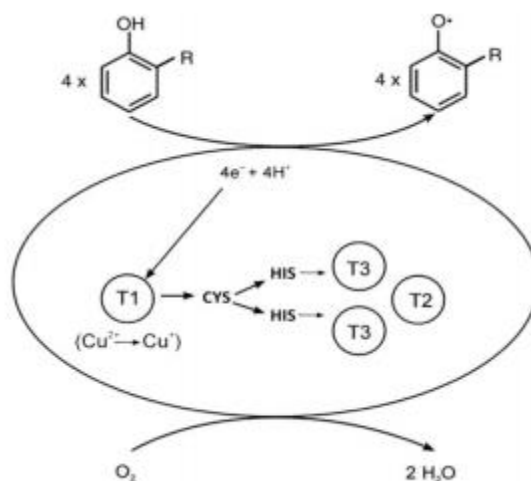


Рис. 2. Каталітичний цикл лакказ [15]

Даний механізм підтверджує відсутність утворення H_2O_2 в ході відновлення кисню [28].

Таким чином реакція, що каталізується лакказою, проходить через наступні стадії:

- Відновлення T1 центра субстратом
- Внутрішньомолекулярний перенос електрона з T1 центру на T2/T3 кластер

- Відновлення молекули кисню до води в T2/T3 кластері [29].

Показано, що склад продуктів окиснення може розрізнятися в залежності від окисно-відновних властивостей ферменту [30]. На основі порівняльного вивчення окиснення декількома лакказами ряду фенолів висунуто припущення, що лімітуючою стадією процесу є перенос електрона з молекули субстрату на T1 центр [31].

До органічних субстратів лакказ відносяться орто- і пара- заміщенні дифеноли, аміно- та поліфеноли, поліаміни, лігніни та арилдіаміни [12]. До неорганічних субстратів, окислення яких каталізує лакказа відноситься ряд іонів, таких як, $[W(CN)_8]^{4-}$, $[Mo(CN)_8]^{4-}$, $[Fe(CN)_6]^{4-}$, VO^{2+} та Mn^{2+} [23]. Лаккази безпосередньо можуть каталізувати окиснення тільки тих субстратів, чий потенціал окиснення не перевищує 0,8 – 1,0 В (відносно нормального водневого електроду (НВЕ)) [23]. У своїх дослідженнях Хи зі співавторами [23] показали, що субстратна специфічність лакказ безпосередньо пов'язана з редокс-потенціалом T1 центру, який для більшості грибних лакказ складає ~ 750-780 мВ (НВЕ), а рослинних ~ 420-440 мВ (НВЕ).

Оптимум рН лакказної активності залежить від типу субстрату і джерела, з якого був отриманий фермент. Для типових субстратів грибних лакказ – фенольних сполук – рН-профіль має дзвоноподібну форму, і знаходиться в діапазоні від 3 до 7. Для деяких рослинних лакказ рН-оптимум окиснення фенольних субстратів може досягати 9 [32].

Каталітична активність грибних лакказ може бути інгібована різними сполуками. Фторид-, азид-, ціанід- і гідроксил-аніони зв'язуються з триядерним кластером активного центру лакказ і інгібують активність ферменту, перешкоджаючи внутрішньомолекулярному переносу електрона [33, 34]. До конкурентних інгібіторів цих ферментів відносяться хлорид-аніони. На відміну від грибних лакказ, рослинні лаккази менш чутливі до інгібування хлорид-аніонами. Інша група інгібіторів лакказ включає іони важких металів (наприклад, Hg^{2+}), жирні кислоти, гідроксигліцин, койєву кислоту, етилендіамінтетраоцтову кислоту і позитивно заряджені четвертинні амонієві детергенти. Ці інгібітори

можуть інактивувати іони міді в активному центрі лакказ [35, 36]. Температурний оптимум більшості лакказ знаходиться в інтервалі від 50 до 70 °C [12].

1.3. Лакказно-медіаторні системи

Як зазначалося вище, лаккази можуть каталізувати окиснення сполук, потенціал іонізації яких близький, чи трохи перевищує редокс-потенціал первинного акцептора електронів цих ферментів – іона міді T1 центра. У 1990 році було показано [37], що використання так званих редокс-медіаторів (або підсилювачів дії) ферментів, дозволяє здійснити ферментативне окиснення сполук із більш високим редокс-потенціалом. Редокс-медіатори представляють собою низькомолекулярні субстрати лакказ, у результаті ферментативного окиснення яких утворюються високореакційні продукти, здатні неферментативно окиснювати різні сполуки, що не є субстратами ферменту. При цьому окиснений медіатор відновлюється до вихідної форми і таким чином формується замкнений цикл (Рис. 3) [38].

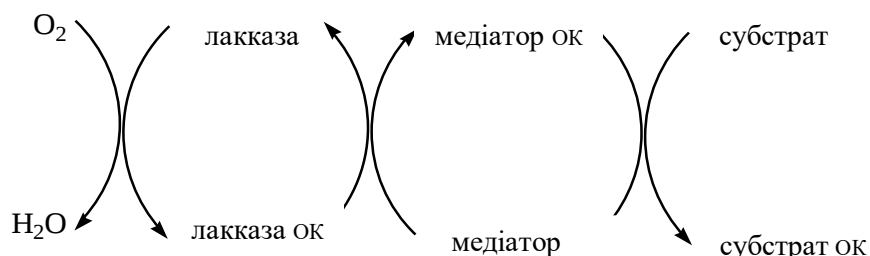


Рис. 3. Схема функціонування лакказно-медіаторних систем

Від вибору редокс-медіатору залежить загальна ефективність лакказно-медіаторної системи. У результаті ферментативного окиснення «ідеального» медіатора повинні утворюватися високо реакційні інтермедіати, а сам медіатор повинен витримувати велику кількість циклів без структурних змін та не інактивувати фермент. Першою сполукою, яка була використана як редокс-

медіатор, була діамонієва сіль 2,2'-азино-біс-(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової) кислоти (АБТС) [37].

До теперішнього часу описано понад 100 редокс-медіаторів лакказ різної природи. Найбільш ефективними з них є сполуки, що містять >N-OH групу, такі як 1-гідроксибензотріазол (ГБТ), *N*-гідроксифталімід (ГФІ), віолурова кислота (ВЛК), *N*-гідроксиацетанілід (ГАА) і 2,2',6,6'-тетраметил-1-піперидинілоксил (ТЕМПО) (Рис. 4) [39].

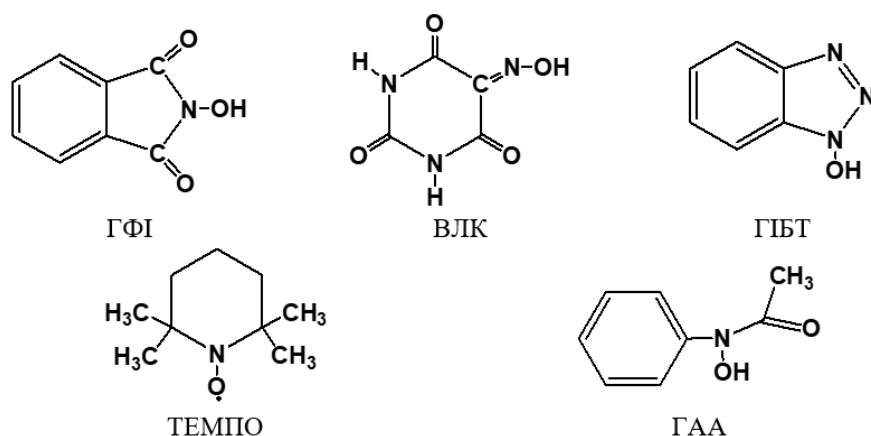


Рис. 4. Структурні формули деяких редокс-медіаторів >N-OH типу і ТЕМПО

При окисненні лакказою >N-OH редокс-медіаторів відбувається перенос електрона на фермент з наступним вивільненням протону, в результаті чого утворюється високо реакційний нітрокисильний радикал (>N-O[•]), який, у свою чергу, здатен окиснювати різні субстрати за радикальним механізмом [40, 41]. Найбільш відомим серед редокс-медіаторів >N-OH типу є 1-гідроксибензотріазол (ГБТ). На відміну від АБТС при лакказно-контрольованому окисненні ГБТ утворюється нестабільний радикал. Тим не менш, цей радикал здатний окиснювати різні нефенольні сполуки, наприклад бензилові спирти з утворенням відповідних альдегідів.

На відміну від радикалів, генерованих із >N-OH сполук, ТЕМПО є стабільним нітрокисильним радикалом, який окиснюється молекулярним киснем у присутності лаккази із формуванням оксо-амонійного іона, що взаємодіє з субстратом за іонним механізмом [37].

Ще одним класом ефективних редокс-медіаторів лакказ є природні заміщенні феноли, що присутні в багатьох грибах і рослинах [42]. Найбільш вивченими редокс-медіаторами фенольного типу є метаболіти грибів білої гнилі: 4-гідроксибензойна кислота і 4-гідроксибензиловий спирт [39, 43].

У ролі медіаторів можуть виступати і такі відомі природні сполуки, як цистеїн і глутатіон [39]. Вони мають у своїй структурі сульфгідрильні групи, в результаті ферментативного окиснення яких утворюються тілльні радикали, що здатні взаємодіяти з субстратами різної природи.

Крім перерахованих вище редокс-медіаторів, підсилювачами дії лакказ можуть бути інші органічні сполуки: нітрозосполуки, похідні трифеніламіну та фенотіазину [44, 45].

До неорганічних медіаторів можна віднести комплекси іонів Mn^{2+} [46], поліоксометалати [47], а також комплекси перехідних металів (наприклад, октоціаномолібдат, октоціановольфрамат калію та ін.) [48].

1.4. Застосування лакказ

У даний час лаккази застосовуються в різних сферах біотехнологій. Основною сферою застосування даного ферменту є біодеградація лігніну та окиснення поліциклічних ароматичних вуглеводнів. Продуктами окиснення поліциклічних ароматичних вуглеводнів є, як правило, відповідні хінони, менш токсичні і більш гідрофільні, які, в свою чергу, також можуть бути субстратами для лаккази.

Існує декілька напрямів практичного використання ферментів, що розкладають лігнін, у тому числі виготовлення біопластиків, відбілювання паперу. На певній стадії біодеградації лігніну деревина набуває пластичності, що дозволяє виготовляти на її основі екологічно безпечні деревні пластики, деревоволокнисті плити, блоки, картон без застосування токсичних зв'язуючих сполук [16]. Активно ведуться дослідження щодо застосування лакказ для відбілювання паперу. При цьому переваги використання лакказ, на відміну від

інших лігнінолітичних ферментів, полягають у тому, що використання системи окиснення на основі даного ферменту та низькомолекулярних медіаторів дозволяє позбутися пероксиду водню в процесі біовідбілювання.

Описано використання лаккази в текстильній промисловості для обробки льону, знебарвлення та фарбування бавовняних тканин [49]. Також цей фермент використовується в косметичній промисловості як агент для фарбування волосся, при виробництві миючих засобів, для біодеградації ксенобіотиків, створення антимікробних композицій, детоксикації та очистки стічних вод, при розробці катодів біопаливних елементів та в інших областях.

Також фермент можна використовувати для заміни токсичних осушників у фарбах. У наш час водоемульсійні фарби містять іони важких металів, які використовуються для прискорення висихання плівок алкідних смол. Іони важких металів відрізняються токсичністю, а каталізатори на основі кобальту виявляють канцерогенні властивості. Тому багато дослідників намагаються підібрати нові агенти, що дозволять забезпечити ефективну сушку фарб і не будуть мати при цьому небажані властивості.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

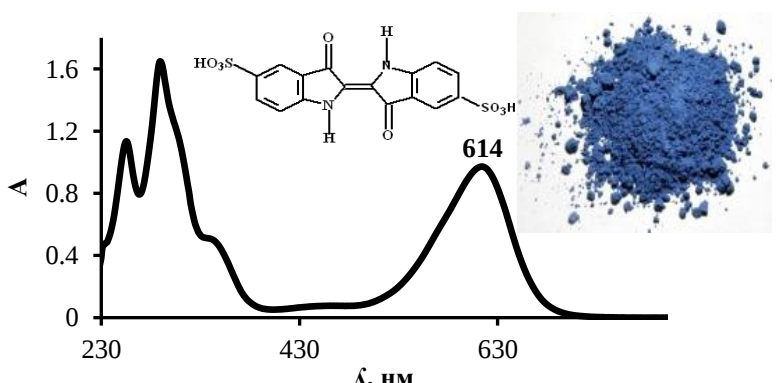
2.1. Обладнання, реактиви та матеріали

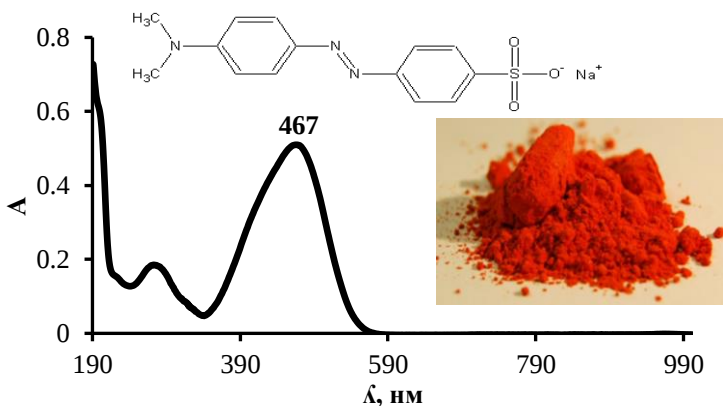
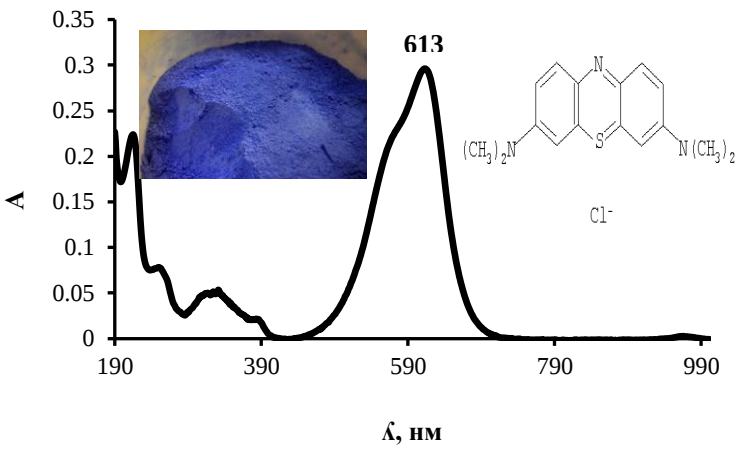
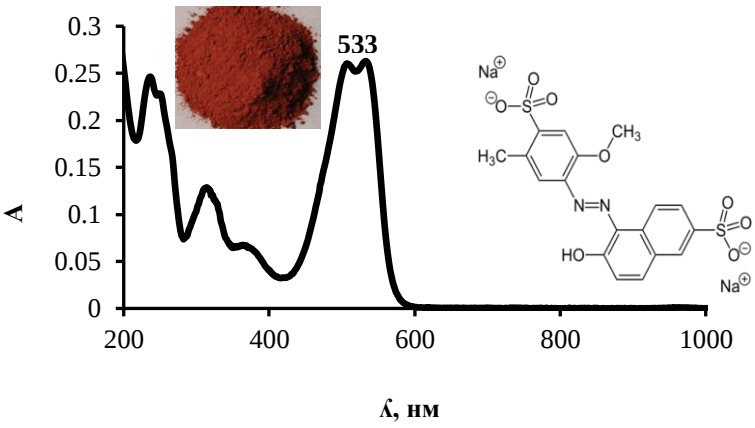
Реактиви та матеріали

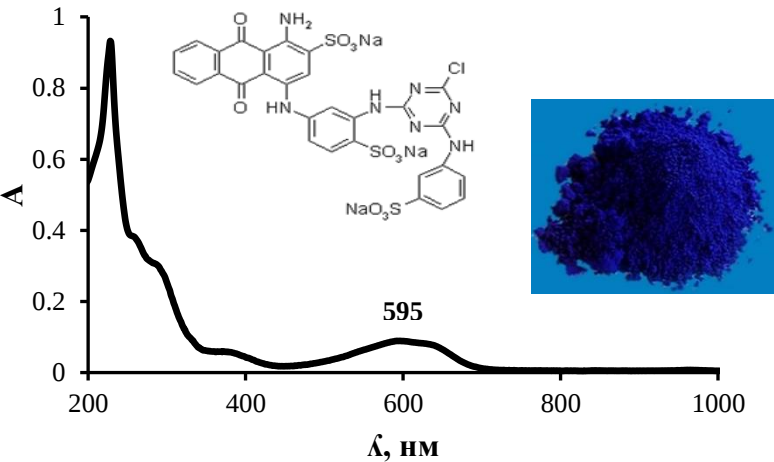
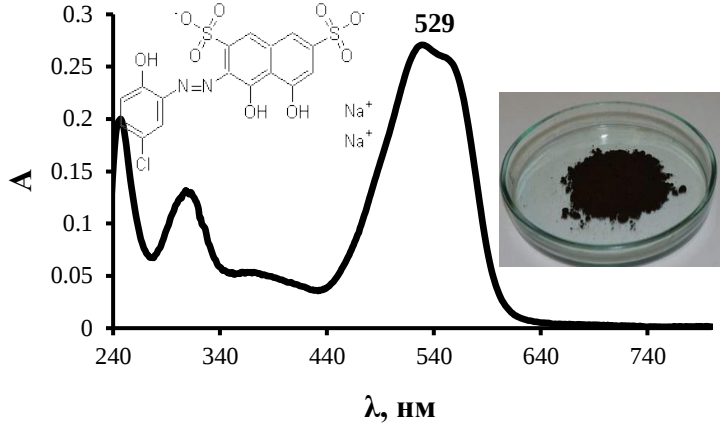
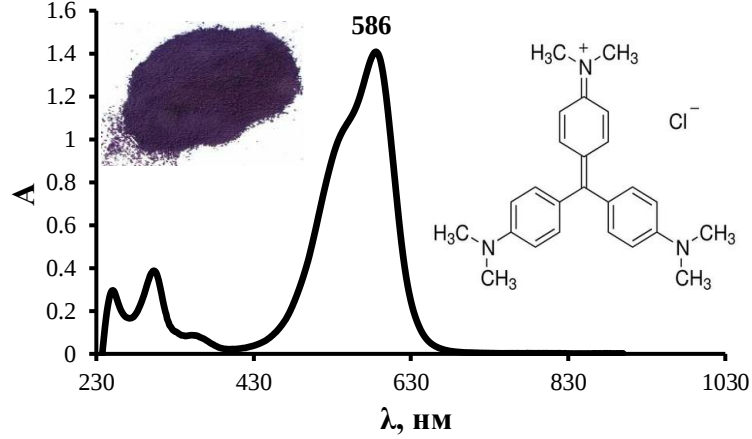
1. 3-(гідроксиіміно)пентан-2,4-діон був синтезований за реакцією нітрозування ацетилацетону [50]. ГПД відноситься до класу оксимів. Він має слабкий О-Н зв'язок [51] і легко утворює іміноксильні радикали $R_2C=NO^{\bullet}$, які є досить стабільними. Оксим недорогий, нетоксичний [52].
2. Лакказа *Trametes versicolor* (*T. versicolor*) – комерційний препарат фірми марки Sigma (Germany).
3. Цитратно-фосфатна буферна система (ЦБС) з рН 4,5 була приготована по Макінлвейну, що містить 0,1 М цитратну кислоту та 0,2 М Na_2HPO_4 .
4. Синтетичні барвники. Структура, зовнішній вигляд, λ_{max} та клас барвників, що були використані у роботі, представлені в таблиці 1.

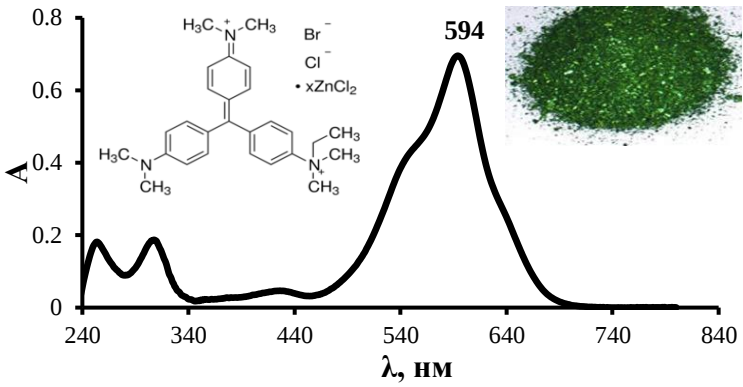
Таблиця 1

Характеристика досліджуваних барвників

Барвник	Структура, λ_{max} та зовнішній вигляд	Клас
1	2	3
Індигокармін		Індигоїдний барвник

1	2	3
Метиленовий помаранчевий		Азобарвник
Метиленовий синій		Тіазиновий барвник
Легкозмиваємий червоний		Азобарвник

1	2	3
Активний яскраво-голубий		Тріазиновий барвник
Хромовий темно-синій		Азобарвник
Метиленовий фіолетовий		Трифенілметановий барвник

1	2	3
Метилений зелений		Трифенілметановий барвник

Барвники є одними з найбільш важливих класів синтетичних промислових хімікатів, які часто присутні в промислових стоках. Це складні стійкі органічні сполуки, які зазвичай класифікують відповідно до основної хромофорної структури, як індигоїдні, азо-, антрахінонові, трифенілметанові та інші барвники. Хромофор є групою атомів, які контролюють колір барвника, наприклад $-C=C-$, $-C=O$, $-C=N$, $-NO_2$, $-N=N-$ або хіноїдні структури. Молекули барвника зазвичай мають одну або кілька ауксохромних груп, а саме $-OH$, $-OCH_3$, $-NH_2$, $-N(CH_3)_2$, $-NH-C_6H_5$ і т. д., що призводить до збільшення ϵ і батохромного зсуву λ_{max} в УФ -видимому спектрі барвника.

Обладнання

УФ-видимі спектри записували на спектрофотометрі Analytic Jena SPECORD 50 з термостатуванням ($\pm 0,1^\circ C$) під управлінням прикладного пакету «WinASPECT» Version:2.5.0.0 в кюветі $l=1$ см. Розходування кисню реєстрували за допомогою термооксиметра «Експерт-001», обладнаного електродом Кларка.

2.2. Підготовка та приготування реактивів

2.2.1. Приготування цитратно-фосфатного буферного розчину

Цитратно-фосфатну буферну систему з рН 4,5 готували за методикою, описаною в роботі [53]. Для цього використовували перекристалізовану цитратну кислоту і Na_2HPO_4 . Зважували 1,1468 г моногідрату цитратної кислоти $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ та 1,2899 г Na_2HPO_4 , розчиняли у 100 мл води і залишали на добу в темному місці. Вимірювання рН буферного розчину проводили на іонімірі універсальному I-160М.

2.2.2. Приготування розчину ферменту лаккази *Trametes versicolor*

Для приготування робочого розчину лаккази 6,2000 мг ферменту розчиняли у 5 мл цитратно-фосфатного буферного розчину. Концентрація лаккази в робочому розчині складала 124 мкг/мл. Розчини барвників та медіатору були приготовані на бідистильованій воді.

2.3. Методи дослідження

У роботі було використано методи електронної абсорбційної спектроскопії та амперометричної киснеметрії. Спектрофотометричний метод аналізу дозволяє кількісно визначати величини, які характеризують поглинання досліджуваною речовиною електромагнітного випромінювання. Вимірювання проводилися в ультрафіолетовій та видимій області спектру, де реєструються електронні спектри абсорбції молекул. Спектрофотометрія у видимій та УФ-областях дозволяє оцінювати ступінь чистоти речовини, ідентифікувати по спектру різні сполуки, визначати константи дисоціації кислот і основ, досліджувати кінетику та рівноваги різних процесів, зокрема комплексоутворення [54]. Окрім спектрофотометричного методу аналізу застосовували метод амперометричної киснеметрії з використанням електрода Кларка [55]. Киснеметричний метод ґрунтується на визначенні кисню в рідинах за величиною струму його катодного відновлення на вимірювальному електроді, який безпосередньо контактує з аналізованим середовищем.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив рН середовища на швидкість знебарвлення індигокарміну

Оптимальна величина рН для більшості лакказ знаходиться, як правило, в області від 3 до 6. Тому для встановлення рН оптимуму каталітичної дії ферменту лаккази *T. versicolor*, було досліджено залежності швидкостей окиснення індигокарміну (ІС) (як модельної реакції) від величини рН в присутності лакказно-медіаторної системи (Рис. 5). Як видно з рисунку оптимум каталітичної активності лаккази знаходиться в області рН 4,5–5,0. Тому у подальшому усі експерименти було виконано у цитратно-фосфатному буферному розчині за рН 4,5.

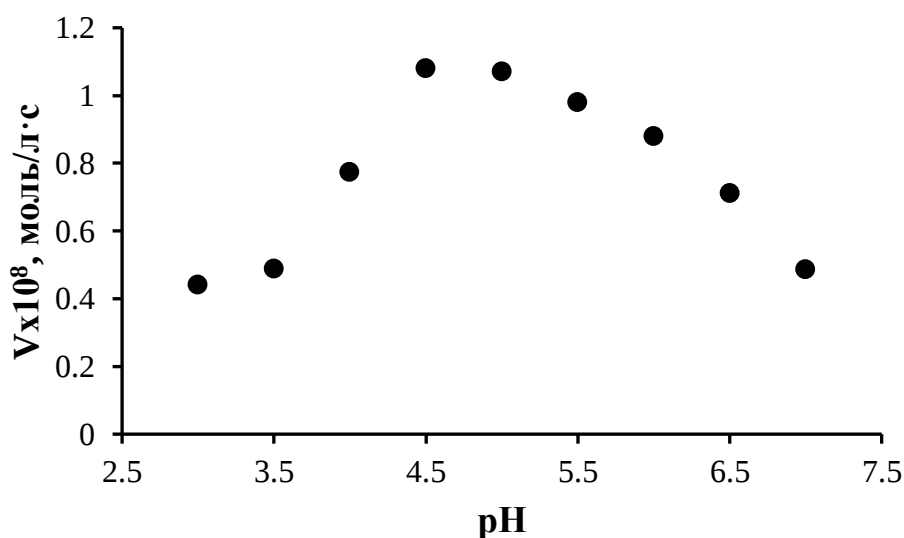


Рис. 5. Залежність швидкості знебарвлення ІС киснем повітря у присутності системи лаккази-ГППД від рН середовища.

$[IC]=2 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[ГППД]=2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$, $C(T.versicolor)=124 \text{ мкг/мл}$, рН 3-7, $T=308 \text{ K}$

3.2. Визначення активності лаккази *Trametes versicolor*

Активність лаккази *T. versicolor* досліджували методом спектрофотометрії та киснеметрії. Міжнародна одиниця активності ферменту

(U) визначається як його кількість, що окиснює в оптимальних умовах 1 μ моль субстрату протягом однієї хвилини. Питома активність виражається в одиницях активності на мг білка. Як субстрат використовували гідрохінон у діапазоні концентрацій $2 \div 0,6$ мМ. Вимірювання проводили при 291 нм ($\epsilon = 3240 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) за $T=308 \text{ K}$. Отримані спектрофотометричним методом дані було оброблено у подвійних обернених координатах Лайнуівера-Берка і розраховано $K_m = 191 \mu\text{M}$ та $V_{\max} = 121 \text{ nM} \times \text{с}^{-1}$. Величини цих же параметрів, визначені киснеметричним методом склали: $K_m = 219 \mu\text{M}$ та $V_{\max} = 190 \text{ nM} \times \text{с}^{-1}$ (Рис. 6). Використовуючи дані було обраховано активність ферменту, що складає 1,05 U/мг та 1,02 U/мг відповідно. Заявлена за паспортом активність комерційного препарату лаккази марки «Sigma» (Germany) складала 0,94 U/мг.

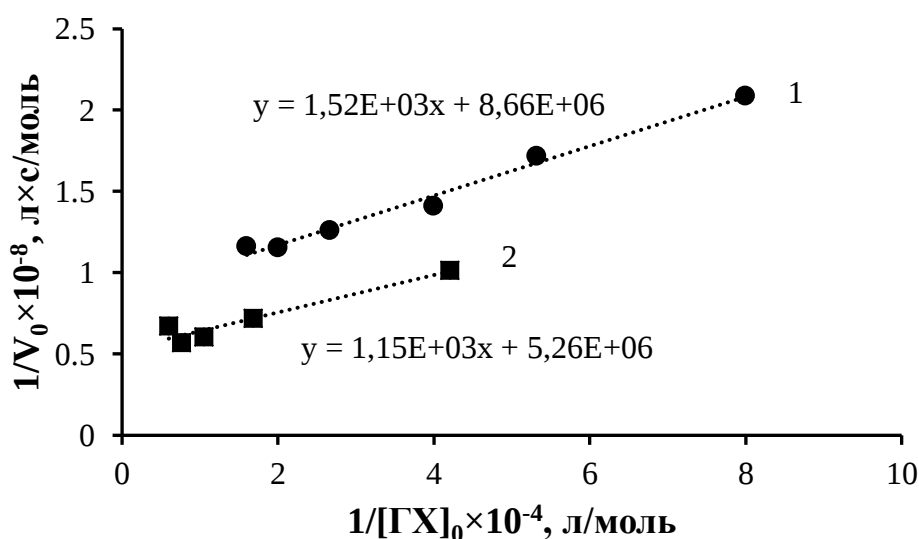


Рис. 6. Залежність початкової швидкості окиснення гідрохінону (ГХ) лакказою від концентрації ГХ у координатах Лайнуівера-Берка, ЦБС рН 4,5, $T=308 \text{ K}$
1-спектрофотометричним методом; 2-киснеметричним методом

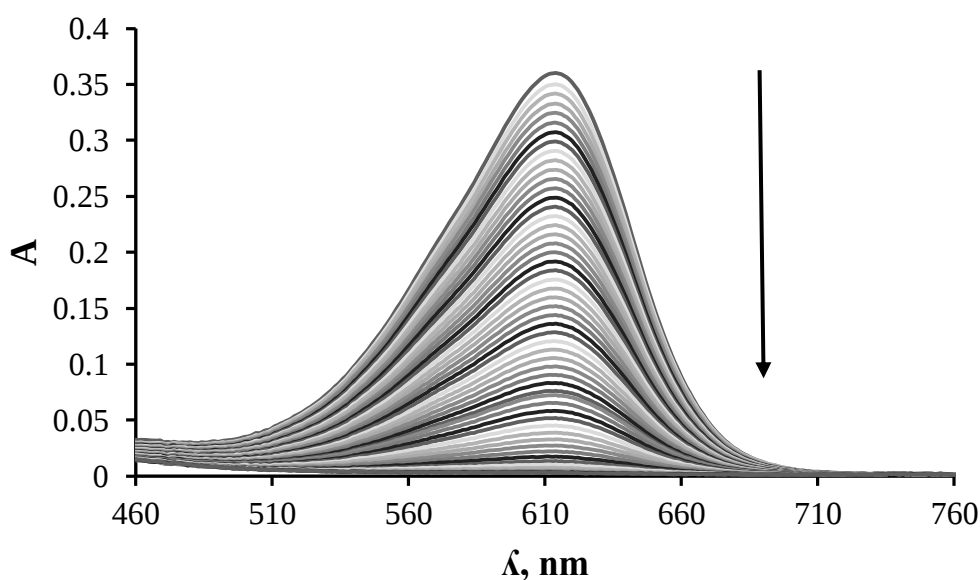
3.3. Ефективність знебарвлення барвників

Детальні дослідження деколоризації розчинів синтетичних барвників системою лакказа-ГПД-кисень повітря представлено для індигоїдного барвника – індигокарміну. Аналогічним чином були досліджені процеси

знебарвлення інших барвників повітрям в присутності лакказно-медіаторної системи.

Спектр ІС має смугу поглинання з трьома максимумами: $\lambda_{\max} = 255, 289$ і 614 нм. Після обробки ІС системою лакказ-ГПД спостерігається різке зменшення абсорбції смуги поглинання з $\lambda_{\max} = 614$ нм. Саме ця смуга відноситься до подвійного зв'язку $C=C$ і контролює синій колір ІС. Молярний коефіцієнт абсорбції при 614 нм було визначено експериментально в цитратно-фосфатному буфері і його величина дорівнює $\varepsilon = 15974 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

На рис. 7 представлено зменшення оптичної густини у смугі поглинання ІС під дією системи лакказ-ГПД в ЦБС з рН 4,5 при 308 K .



*Рис. 7. Кінетика зміни оптичної густини розчину ІС при його каталізованому лакказно-медіаторною системою окисненні, ЦБС рН 4,5, $T=308 \text{ K}$
 $[IC]=2 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[ГПД]=2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$, $C(T.\text{versicolor})=124 \text{ мкг/мл}$*

В УФ-спектрі після знебарвлення ІС системою лакказ-ГПД з'являються нові смуги поглинання з $\lambda_{\max} = 302$ та 369 нм, які відповідають основним продуктам розпаду ІС – ізатин-5-сульфоновій кислоті і 5-сульфоантраніловій

кислоті [56] (Рис. 8). Це підтверджується співпадінням спектрів абсорбції чистих речовин та реакційних сумішей після завершення процесу деколоризації.

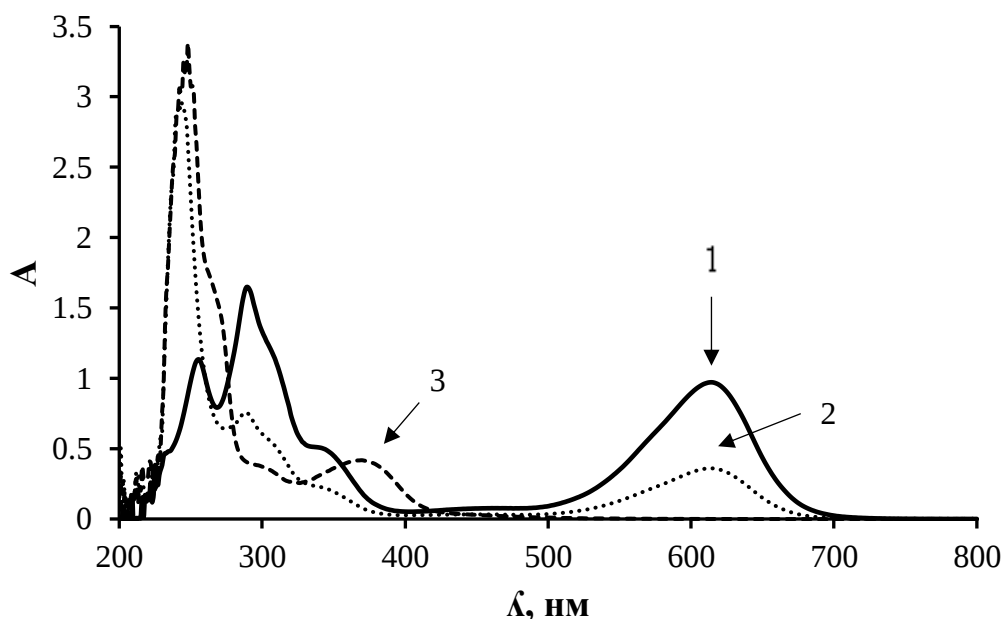


Рис. 8. Електронні спектри абсорбції розчинів ІС: 1-вихідний розчин ІС в буфері; 2- після обробки системою лаккази-ГПД; 3- після повного знебарвлення $[IC]=2 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[ГПД]=2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$, $C(T.\text{versicolor})=124 \text{ мкг/мл}$, ЦБС рН 4,5, $T=308 \text{ K}$

На рис. 9, представлено кінетичні криві витрачання ІС у цитратно-фосфатному буфері при рН 4,5. Видно, що лише лаккази чи тільки ГПД майже не каталізують процес знебарвлення, оскільки індигокармін витрачається дуже повільно. Натомість, при каталізі сумішшю лаккази та ГПД спостерігається швидкий розхід ІС. Розчин знебарвлюється протягом 40–45 хв і смуга поглинання $\lambda=614 \text{ nm}$ повністю зникає.

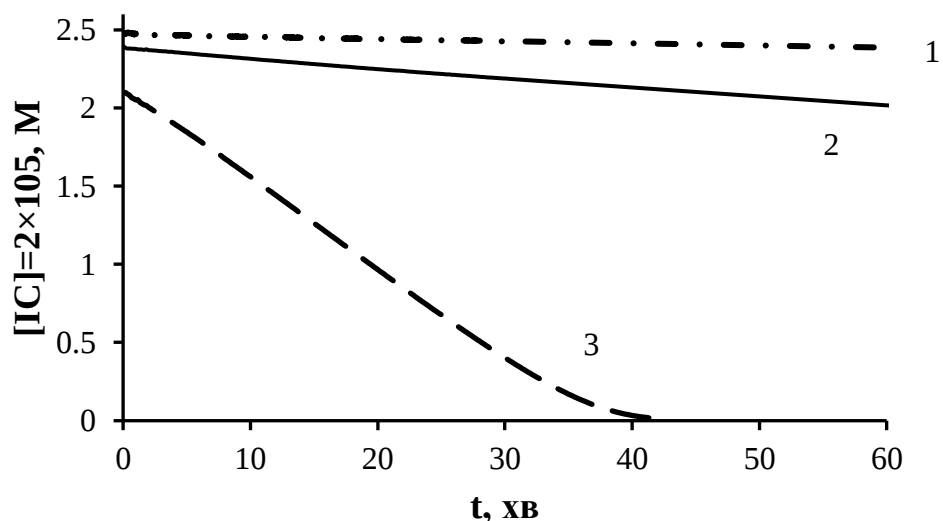


Рис. 9. Кінетичні криві витрачання ІС при каталізі його окиснення: 1-лаказою; 2- ГППД; 3-лакказно-ГППД системою, ЦБС рН 4,5, $T=308\text{ K}$
 $[IC]=2 \times 10^{-5}\text{ M}$, $[ГППД]=2,4 \times 10^{-4}\text{ M}$, $C(T.versicolor)=124\text{ мкг/мл}$

Для з'ясування ефективності роботи біокаталітичної системи лакказно-ГППД та порівняння її активності у повторних каталітичних циклах було проведено багаторазове знебарвлення ІС. Концентрації барвника, фермента та медіатора залишалися незмінними. Вихідна концентрація барвника залишалася постійною у кожному з циклів та дорівнювала $2 \times 10^{-5}\text{ M}$. Результати цих експериментів наведено на рис. 10.

Ефективність знебарвлення барвника розраховували за формулою (1):

$$\text{Ефективність знебарвлення (\%)} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

де C_0, t – концентрація барвника на початку реакції та після знебарвлення, відповідно.

Як видно з представлених на рис. 10 та 11 даних, для такої системи спостерігається незначне зменшення ефективності каталізу при переходах від циклу до циклу, що дає можливість її багаторазового використання для очищення стічних та оборотних вод.

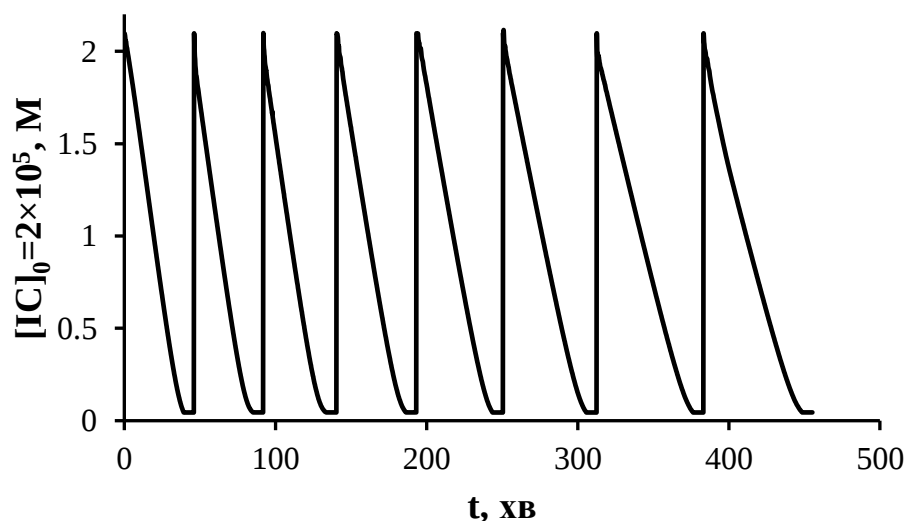


Рис. 10. Кінетичні криві витрачання ІС у повторних каталітичних циклах його окиснення, ЦБС рН 4,5, $T=308\text{ K}$

$[IC]=2 \times 10^{-5}\text{ M}$, $[ГПД]=2,4 \times 10^{-4}\text{ M}$, $C(T.versicolor)=124\text{ мкг/мл}$

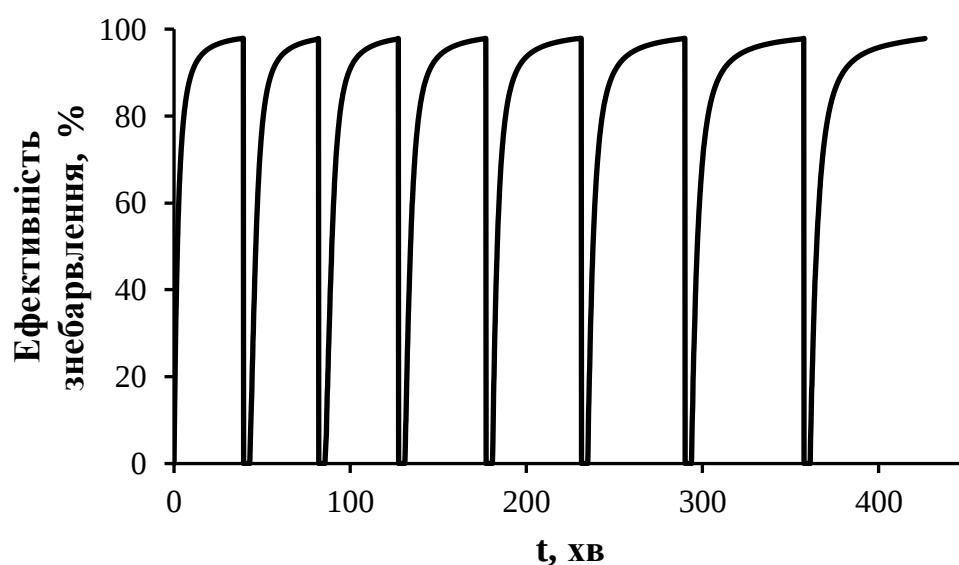


Рис. 11. Повторне знебарвлення ІС киснем повітря у присутності системи лаккази-ГПД, ЦБС рН 4,5, $T=308\text{ K}$

$[IC]=2 \times 10^{-5}\text{ M}$, $[ГПД]=2,4 \times 10^{-4}\text{ M}$, $C(T.versicolor)=124\text{ мкг/мл}$

З кожним циклом швидкість знебарвлення ІС зменшується (Рис. 12). Поясненням такого ефекту може бути інактивація лаккази внаслідок хелатування

іонів міді в активному центрі ферменту медіатором-оксимом, хелаторні властивості якого добре відомі. Але таке припущення потребує додаткових досліджень.

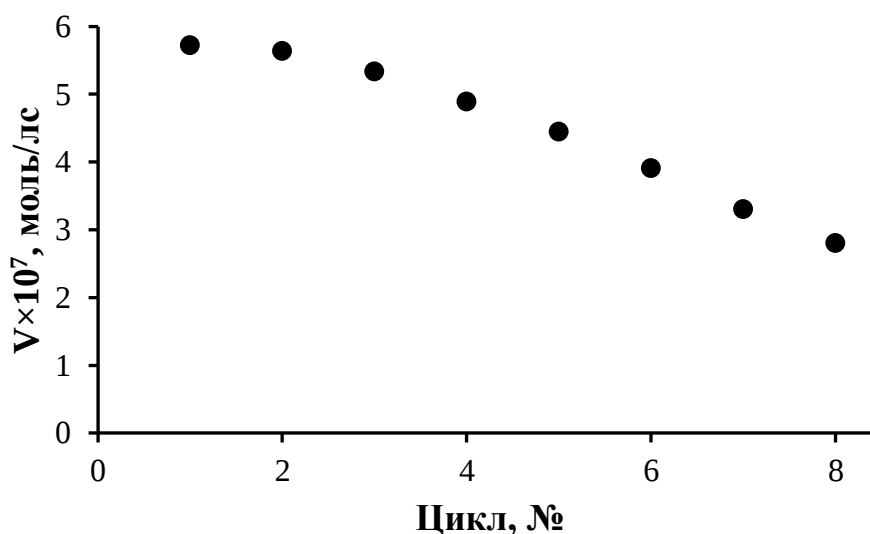


Рис. 12. Зміна швидкості знебарвлення ІС від цикла до циклу в присутності системи лаккази-ГППД, ЦБС рН 4,5, $T=308 \text{ K}$
 $[IC]=2 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[ГППД]=2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$, $C(T.versicolor)=124 \text{ мкг/мл}$

Для оцінки субстратної специфічності ферменту та ефективності лакказно-медіаторної системи було випробувано барвники різної структури (Табл. 1). Розчини барвників витримували у буферному розчині протягом 30 хв у присутності лише лаккази або лакказно-медіаторної каталітичної системи. Результати наведено на рис. 13. Видно, що ефективність біокаталітичної системи лаккази-ГППД у всіх випадках є вищою у порівнянні з лакказою. При цьому, азобарвник хромовий темно-синій, тіазиновий барвник метиленовий синій і активний яскраво-голубий, що відноситься до класу тріазинових барвників, проявляють достатньо високу активність як субстрати лаккази *T. versicolor*.

Індигокармін, трифенілметанові барвники (метиленовий зелений і метиленовий фіолетовий), азобарвники (метиленовий помаранчевий і легкозмиваємий червоний) не знебарвлюються, тобто вони не є субстратами лаккази. Наведені дані свідчать про те, що використання лише лаккази у

більшості випадків є малоефективним – знебарвлення ІС відбулося на 2%, метилового помаранчевого на 5%, легкозмиваємого червоного на 0,8%.

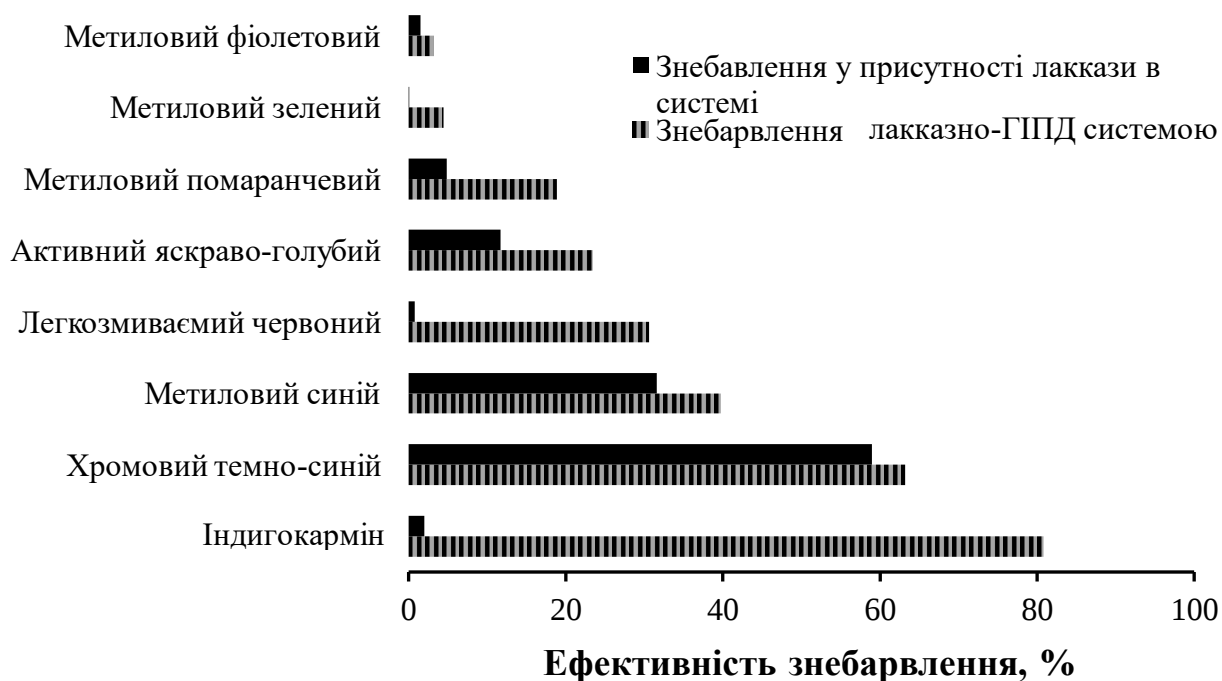


Рис. 13. Ефективність знебарвлення розчинів різних барвників молекулярним киснем під дією лаккази *Trametes versicolor* та системи – лаккази-ГПД через 30 хв від початку реакції, ЦБС рН 4,5, $T=308\text{ K}$
 $[Барвник]=2 \times 10^{-5}\text{ M}$, $[ГПД]=2,4 \times 10^{-4}\text{ M}$, $C(T.versicolor)=124\text{ мкг/мл}$

Ефективність системи лаккази-ГПД у процесах окиснення синтетичних барвників киснем повітря визначали як частку їх витрачання за 30 хв від початку перебігу реакції. Найбільший відсоток спостерігався для ІС – 80,8 %. Для легкозмиваємого червоного – 30,6 %. Для барвників, які є субстратами лаккази, відбувається збільшення ефективності знебарвлення порівняно з використанням вільного ферменту. Наприклад, для метиленового помаранчевого ефективність збільшилась на 14,6 %, активного яскраво-голубого – 11,7 %, метиленового синього – 8,1 %, хромового темно-синього – 4,25 %. У той же час, запропонована лакказно-медіаторна система є малоефективною для трифенілметанових барвників – метиленового фіолетового та метиленового зеленого.

Повна деколоризація (100 %) досліджуваних барвників в умовах експерименту досягається для ІС через 43 хв, легкозмиваємого червоного – 166 хв, метиленового помаранчевого – 215 хв, хромового темно-синього – 380 хв, метиленового синього – 410 хв, метиленового фіолетового – 571 хв.

3.4. Механізм окиснення барвників з використанням системи лаккази – ГПД

Можливий механізм окиснення барвників представлено на рис. 14. Він включає два спряжених каталітичних цикли - перший за участю фермента і медіатора, другий – радикала медіатора і барвника. Каталітичний сайт лаккази має чотири іона міді. Мідь типу Т1 бере участь в окисненні медіатора і діє як первинний акцептор електронів. Мідь типу Т2 разом з двома іонами міді типу Т3 утворюють триядерний мідний кластер, де відбувається зв'язування і відновлення однієї молекули кисню до двох молекул води. ГПД окиснюється мідним центром лаккази Т1 до іміноксильного радикала, які далі бере участь в неферментативному окисненні субстрату.

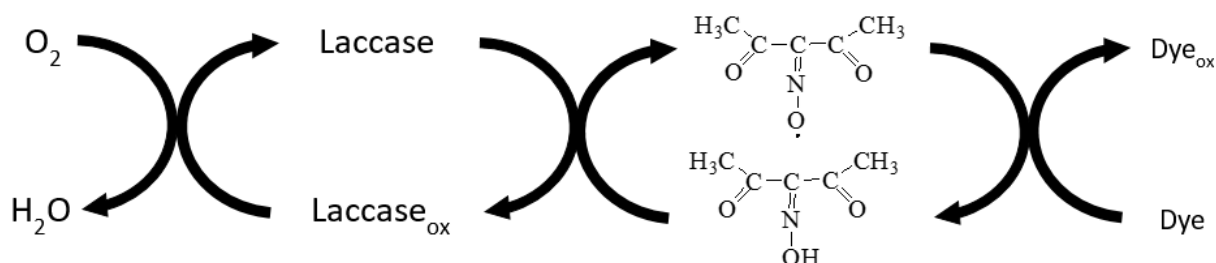


Рис. 14. Механізм окиснення барвників у присутності біокаталітичної системи лаккази – ГПД.

Для барвників, які є субстратами лаккази, окиснення може каталізуватися безпосередньо ферментом.

3.5. Дослідження фітотоксичності барвників

Більшість синтетичних барвників можуть бути токсичними для водних організмів і рослин, проявляти алергічні, канцерогенні та мутагенні властивості.

Одним із завдань процесу ферментативної деградації є зменшення або усунення токсичності барвників. Використання ферментативної деградації у процесі знебарвлення барвників є досить ефективним, що приводить до зменшення забарвлення стічних вод та усунення їхньої токсичності [57-59]. Щоб порівняти фітотоксичність необроблених барвників, а також оброблених лакказно-медіаторною системою, ми використовували насіння сімейства люцерни *Medicago sativa* (Рис. 15) через те, що воно добре проростає при рН 4,5 [60], а оптимум рН для роботи системи лакказ-ГПД також дорівнює 4,5. Повна деградація барвників була підтверджена спектрофотометрично. Крім того, ГПД і буфер були протестовані окремо в попередніх дослідках, і результат показали, що вони не мають значного токсичного ефекту.



Рис.15. Люцерна посівна.

Визначення токсичності барвників до та після обробки лакказ-ГПД системою проводили за методом, описаним у роботі [57].

У чашку Петрі на фільтрувальний папір поміщали 20 насінин люцерни і заливали 3 мл досліджуваного розчину, уникаючи утворенню пазирів повітря для проростання люцерни. Насіння розміщували на однаковій відстані одне від одного та інкубували протягом 5 днів у темному місці при температурі 295 ± 2 К. Як контроль використовували дистильовану воду. Кожний зразок був протестований чотири рази. Відсоток проростання насіння розраховували за формулою (2):

$$\% \text{ Проростання} = \frac{\text{Кількість пророщеного насіння}}{\text{Загальна кількість насіння}} \cdot 100. \quad (2)$$

Спостерігається різке збільшення проростання насіння для більшості барвників, які були оброблені лакказно-ГПД системою. Покращення проростання насіння відбувається для хромового темно-синього та ІС на 35%, а для легкозмиваємого червоного на 15 %. Для метиленового синього інтенсивність проростання не змінювалась до та після обробки системою лакказа-ГПД (Рис 16).

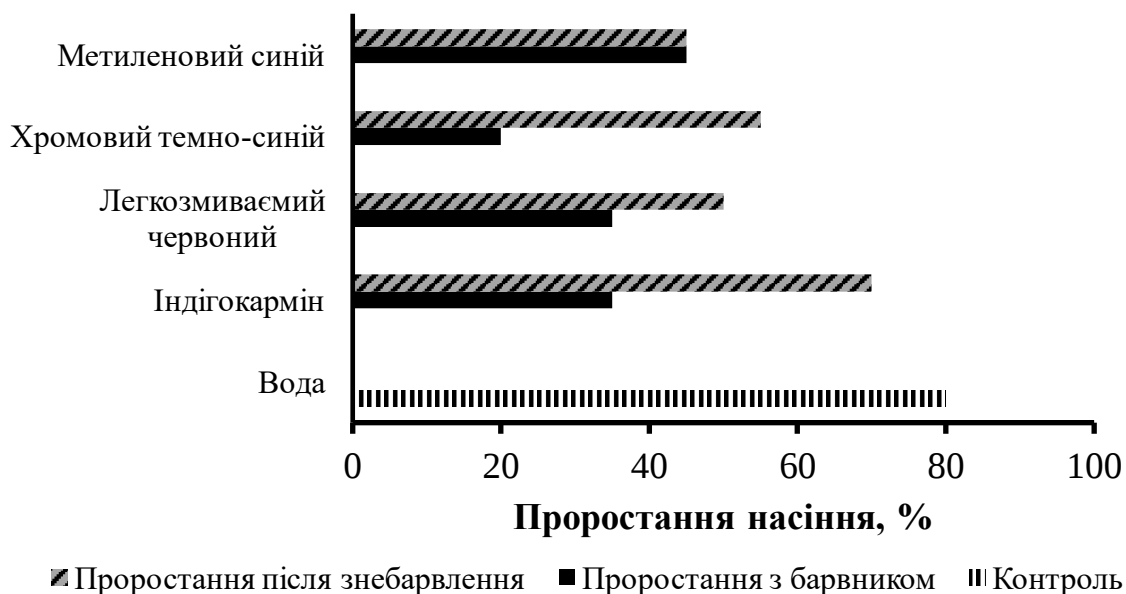


Рис.16. Залежність проростання насіння люцерни від середовища.

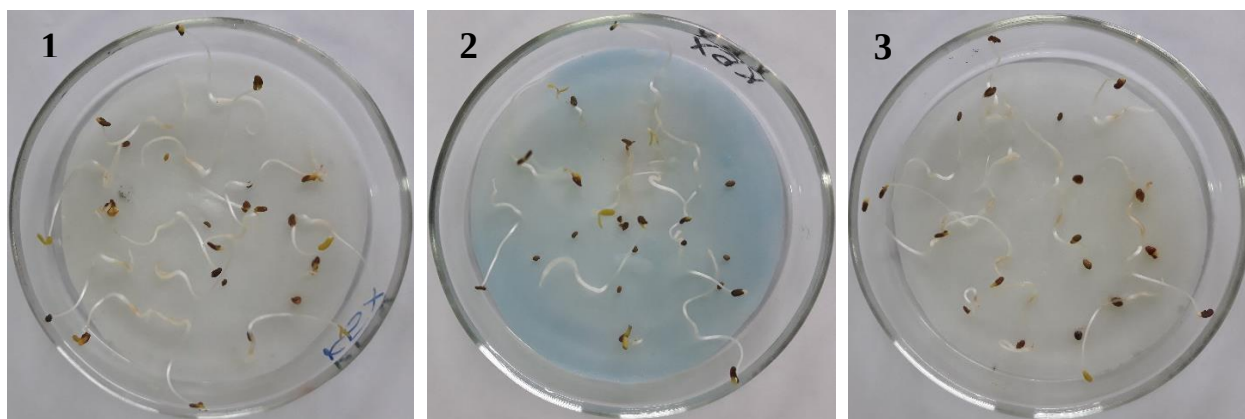


Рис.17. Проростання насіння люцерни в різному середовищі. 1 – контроль; 2 – розчин ІС до обробки лакказно-медіаторною системою; 3 – після обробки лакказно-медіаторною системою

$[IC]=1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[ГПД]=2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$, $C(T.versicolor)=124 \text{ мкг/мл}$, ЦБС рН 4,5,
 $T=295 \pm 2 \text{ K}$

ВИСНОВКИ

1. Вперше запропоновано і досліджено оксим 3-(гідроксиіміно)пентан-2,4-діон як медіатор лаккази *Trametes versicolor*. Показано перспективність системи лаккази – 3-(гідроксиіміно)пентан-2,4-діон в «зелених» процесах деградації індигоїдних, азо-, тріазинових та тіазинових барвників. Разом з тим, для трифенілметанових барвників досліджена біокаталітична система малоефективна.
2. Найвища ефективність системи лаккази – 3-(гідроксиіміно)пентан-2,4-діон в умовах експерименту спостерігається при знебарвленні киснем повітря індигокарміну (100 % знебарвлення через 43 хв) та легкозмиваємого червоного (166 хв).
3. Досліджено фітотоксичність розчинів барвників до і після обробки лакказно-медіаторною системою. Показано, що відсоток проростання насіння люцерни (*Medicago sativa*) після деколоризації синтетичних барвників лакказно-медіаторною системою помітно збільшується для барвників: індигокарміну та хромового темно-синього на 35 %, легкозмиваємого червоного на 15 %. Токсичність розчинів метиленового синього до та після обробки не змінилась. Отримані результати свідчать про безпечність даної біокаталітичної системи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. UN-Water (2018) World Water Development Report 2018: Nature-based Solutions for Water, Geneva, Switzerland.
2. Chandrakant R. Holkar, Ananda J. Jadhav, Dipak V. Pinjari, Naresh M. Mahamuni, Aniruddha B. Pandit. A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. *Journal of Environmental Management*. 2016. Vol. 182. P. 351-366.
3. Alneyadi A.H., Iltaf S., Synan F.A., Syed S. A. Differential degradation and detoxification of an aromatic pollutant by two different peroxidases. *Biomolecules*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 31.
4. Iqbal M., Nisar J. Cytotoxicity and mutagenicity evaluation of gamma radiation and hydrogen peroxide treated textile effluents using bioassays. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2015. Vol. 3, № 3. P.1912-1917.
5. Terres J., Battisti R., Andreus J., de Jesus P.C. Decolorization and degradation of Indigo Carmine dye from aqueous solution catalyzed by horseradish peroxidase. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2014. Vol. 32, № 1. P. 64-73.
6. Wohlgemuth, R., Plazl, I., Žnidaršič-Plazl, P., Gernaey, K.V., Woodley, J.M. Microscale technology and biocatalytic processes: opportunities and challenges for synthesis. *Trends in Biotechnology*. 2015. Vol. 33, № 5. P. 302–314.
7. Alneyadi A. H., Rauf M. A., Ashraf S. S. Oxidoreductases for the remediation of organic pollutants in water a critical review. *Critical reviews in biotechnology*. 2018. Vol. 38, № 7. P. 971-988.
8. Munk, L., Sitarz, A.K., Kalyani, D.C., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnology advances*. 2015. Vol. 33, № 1. P. 13-24.
9. Ramires-Montoya L.A., Hernandez-Montoya V., Montes-Moran M.A., Jauregui-Rincon J., Cervantes F.J. Decolorization of dyes with different molecular properties using free and immobilized laccases from *Trametes versicolor*. *Journal of Molecular Liquids*. 2015. Vol. 212. P 30-37.

10. Lee, S.-K., George, S.D., Antholine, W.E., Hedman, B., Hodgson, K.O., Solomon, E.I *Journal of the American Chemical Society*. 2002. Vol. 124, № 21. P. 6180–6193.
11. Mogharabi M., Faramarzi M.A. Laccase and laccase-mediated systems in the synthesis of organic compounds. *Advanced Synthesis and Catalysis*. 2014. Vol. 356, № 5. P. 897-927.
12. Baldrian P. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006. Vol. 30, № 2. P. 215-242.
13. Gupta N., Lee F.S., Farinas E.T. Laboratory evolution of laccase for substrate specificity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010. Vol. 62, № 3-4. P. 230-234.
14. Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry *Trends in Biotechnology*. 2006. Vol. 24, № 5. P. 219-226.
15. Nunes, C.S., Kunamneni, A. Laccases—properties and applications. *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. 2018. Vol. 7. P. 133-161.
16. Yoshida H. Chemistry of lacquer (Urushi). *Journal of Chemical Society (Japan)*. 1883. Vol. 43. P. 472-486.
17. Xiuyan Zhao, Fei Chang, Zemin Fang, Yinliang Zhang, Yazhong Xiao. Bioinformatic analysis and characterization of myxobacteria laccase-like multicopper oxidases. *Chinese Journal of Biotechnology*. 2017. Vol. 33, № 4: P.609–619.
18. Claus H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 2004. Vol. 35, № 1- 2. P. 93–96.
19. Niladevi K.N., Jacob N., Prema P. Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: purification and characterization. *Process Biochemistry*. 2008. Vol. 43, № 6. P. 654-660.
20. Fang Z.-M., Li T.-L., Chang F., Zhou P., Fang W., Hong Y.-Z., Zhang X.-C., Peng H., Xiao Y.-Z. A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability. *Bioresource Technology*. 2012. Vol. 111. P. 36-41.

21. Claus H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*. 2003. Vol. 179, № 3. P. 145-150.
22. M. Nagai T. Sato H. Watanabe K. Saito M. Kawata H. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Microbiol Biotechnology*. 2002. Vol. 60, № 3. P. 327–335.
23. E.N. Polishchuk, A.G. Kovalenko Biological activity of glycopolymers from Basidiomycetes mushrooms. *Biopolymers and cell*. 2009. Vol. 25, № 3. P. 181- 193.
24. Tetsch L., Bend J., Hölker U. Molecular and enzymatic characterization of extra- and intracellular laccases from the acidophilic ascomycete. *Hortaea acidophila Antonie van Leeuwenhoek*. 2006. Vol. 90, № 2. P. 183-194.
25. Hu, J., Lu, K., Dong, S., Huang, Q., Mao, L. Inactivation of Laccase by the Attack of As(III) Reaction in Water. *Environmental Science & Technology*. 2018. Vol. 52, № 5. P. 2945–2952.
26. Brogioni, B., Biglino, D., Sinicropi, A., Reijerse, E. J., Giardina, P., Sannia, G., Pogni, R. Characterization of radical intermediates in laccase-mediator systems. A multifrequency EPR, ENDOR and DFT/PCM investigation. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2008. Vol. 10, № 48. P. 7284.
27. Zhukova Yu.N., Lyashenko A.V., Lashkov A.A., Gur'yanov V.A., Kobyl'skaya Yu.V., Zhukhlistova N.E., Mikhailov A.M. Atomic structure of unligated laccase from *Cerrena maxima* at 1.76 Å resolution and its complexes with molecular oxygen and hydrogen peroxide. *Crystallography Reports*. 2010. Vol. 55, № 3. P. 436-447.
28. Su, J., Fu, J., Wang, Q., Silva, C., Cavaco-Paulo, A. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017. Vol. 38, № 2. P. 294–307.
29. Ivnitski D., Atanassov P. Electrochemical studies of intramolecular electron transfer in laccase from *Trametes versicolor*. *Electroanalysis*. 2007. Vol. 19, № 22. P. 2307–2313.

30. Kues U., Ruhl M. Multiple multi-copper oxidase gene families in basidiomycetes-what for? *Current genomics*. 2011. Vol. 12, № 2. P. 72-94.
31. Xu F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*. 1996. Vol. 35, № 23. P. 7608–7614.
32. 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. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996. Vol. 1292, № 2. P. 303-311.
33. Lorenzo, M., Moldes, D., Rodríguez Couto, S., Sanromán, M. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere*. 2005. Vol. 60, № 8. P. 1124–1128.
34. Johannes C., Majcherczyk A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*. 2000. Vol. 78, № 2. P. 193-199.
35. Galai S., Limam F., Marzouki M.N. A new *Stenotrophomonas maltophilia* strain producing laccase. Use in decolorization of synthetic dyes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009. Vol. 158, № 2. P. 416-431.
36. Odeniyi O.A., Unuofin J.O., Adebayo-Tayo B.C., Wakil S.M., Onilude A.A. Production characteristics, activity patterns and biodecolourisation applications of thermostable laccases from *Corynebacterium efficiens* and *Enterobacter ludwigii* *Journal of Scientific and Industrial Research*. Vol. 76, № 9. P. 562-569.
37. Bourbonnais R., Paice M.G. Oxidation of non-phenolic substrates. *FEBS letters*. 1990. Vol. 267, № 1. P. 99-102.
38. Fabbrini M., Galli C., Gentili P. Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002. Vol. 18, № 1-3. P. 169-171.
39. Ashe B., Nguyen L.N., Hai F.I., Lee D.-J., Van de Merwe J.P., Leusch F.D.L., Nghiem L.D. Impacts of redox-mediator type on trace organic contaminants degradation by laccase: Degradation efficiency, laccase stability and effluent

- toxicity. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2016. Vol. 113, № 1- 8. P. 169–176.
40. Johannes C., Majcherczyk A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and environmental microbiology*. 2000. Vol. 66, № 2. P. 524-528.
 41. Xu F., Kulys J.J., Duke K., Li K., Krikstopaitis K., Deussen H.-J.W., Abbate E., Galinyte V., Schneider P. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N- hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. Vol. 66, № 5. P. 2052-2056.
 42. Bourbonnais R., Paice M.G., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997. Vol. 63, № 12. P. 4627-4632.
 43. Camarero S., Ibarra D., Martínez M.J., Martínez Á.T. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71, № 4. P. 1775-1784.
 44. Nady N., Schroën K., Franssen M.C.R., Eldin M.S.M., Zuilhof H., Boom R.M. Laccase-catalyzed modification of PES membranes with 4-hydroxybenzoic acid and gallic acid. *Journal of Membrane Science*. 2012. Vol. 394-395. P. 69-79.
 45. Fabbrini M., Galli C., Gentili P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002. Vol. 16, № 5-6. P. 231-240.
 46. . Atsuko Sano, Shiomi Yagi, Tomoyuki Haraguchi, Takashiro Akitsu. Synthesis of Mn-II and Cu-II complexes including azobenzene and its application to mediators of laccase for biofuel cells. *Journal of the Indian Chemical Society*. 2018. Vol. 95, № 5. P. 487-494.
 47. Kim S., Silva C., Evtuguin D.V., Gamelas J.A., Cavaco-Paulo A. Polyoxometalate/laccase-mediated oxidative polymerization of catechol for textile dyeing. *Microbiology and Biotechnology*. 2011. Vol. 89, № 4. P. 981– 987.

48. Gamelas J.A.F., Tavares A.P.M., Evtuguin D.V., Xavier A.M.B. Oxygen bleaching of kraft pulp with polyoxometalates and laccase applying a novel multi-stage process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2005. Vol. 33, № 3- 6. P. 57-64.
49. Gorbacheva M., Morozova O., Shumakovich G., Streltsov A., Shleev S., Yaropolov A. Enzymatic oxidation of manganese ions catalysed by laccase. *Bioorganic Chemistry*. 2009. Vol. 37, № 1. P. 1-5.
50. Nikitina P. A., Kuz'mina L. G., Perevalov V. P., Tkach I. I. Synthesis and study of prototropic tautomerism of 2-(3-chromenyl)-1-hydroxyimidazoles. *Tetrahedron*. 2013. Vol. 69, № 15. P. 3249-3256.
51. Eisenhauer B.M., Wang M., Brown R.E., Labaziewicz H., Ngo M., Kettinger K. W., Mendenhall G.D. Spectral and kinetic measurements on a series of persistent iminoxyl radicals. *Journal of physical organic chemistry*. 1997. Vol. 10, № 10. P. 737–746.
52. Kompanets M., Kameneva T., Zosenko O., Krylov I., Shendryk O. The Activity of 3-(hydroxyimino)pentan-2,4-dione in the reactions with radicals. *Proc. Shevchenko Sci. Soc. Chem. Sci*. 2017. Vol. 48. P. 119–127.
53. Досон Р. Справочник биохимика / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
54. Казицына Л.А. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектропии в органической химии / Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979. – 240 с.
55. Westbroek P., Temmerman E. In line measurement of chemical oxygen demand by means of multipulse amperometry at a rotating Pt ring — Pt/PbO₂ disc electrode. *Analytica Chimica Acta*. 2001. Vol. 437, № 1, P. 95-105.
56. Coelho M.G., de Lima G.M., Augusti R., Maria D.A., Ardisson J.D. New materials for photocatalytic degradation of Indigo Carmine – Synthesis, characterization and catalytic experiments of nanometric tin dioxide-based composites. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2010. Vol. 96, № 1-2. P. 67–71.

57. Garcia, J.C., Simionato, J.I., Almeida, V.D.C., Palácio, S.M., Rossi, F.L., Schneider, M.V., Souza, N.E.D. Evolutive follow-up of the photocatalytic degradation of real textile effluents in TiO_2 and $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ systems and their toxic effects on *Lactuca sativa* seedlings. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009. Vol. 20, № 9. P. 1589-1597.
58. Young B.J., Riera N.I., Beily M.E., Bres P.A., Crespo D.C., Ronco A.E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2012. Vol. 76. P. 182-186.
59. Millioli V.S., Servulo E.L.C., Sobral L.G.S., De Carvalho D.D. Bioremediation of crude oil-bearing soil: evaluating the effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. *Global NEST Journal*. 2009. Vol. 11, № 2. P. 181-188.
60. Ryan J., Seiichi M., Stroehlein J.L. Effect of acidity on germination of some grasses and alfalfa. *Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives*. 1975. Vol. 16, № 28.2. P. 154-155.