

GLIVNE LAKAZE: ENCIMI NEVERJETNIH SPQSQBNQSTI

Fungal laccases: enzymes of incredible abilities

Povzetek: Lakaze so zunajcelični encimi, ki spadajo med bakrove oksidaze. V naravi so prisotne pri mnogih organizmih ter opravljajo različne naloge. Pri lesnih glivah so lakaze sestavni del ligninolitičnega encimskega sistema, ki glivam omogoča razkroj lignina. Lakaze katalizirajo enoelektronske oksidacije številnih organskih substratov, obenem pa poteče redukcija molekularnega kisika do vode. Pri reakciji nastanejo kationski prosti radikali. Zaradi nespecifične oksidacijske sposobnosti so lakaze uporabne za številne biotehnološke procese, sistem lakaze in mediatorjev pa možnosti njihove uporabe še dodatno povečuje.

Ključne besede: glive, lakaze, mediatorji, sistem lakaze in mediatorjev.

Abstract: Laccases are extracellular enzymes, belonging to copper-containing oxidases. They are ubiquitous in nature and thus found in many organisms, where they have different functions. Fungal laccases are part of the ligninolytic system, which enables fungi the degradation of lignin. Laccases catalyze monoelectronic oxidation of various organic substrates, which occurs concomitantly with the reduction of molecular oxygen to water. The reaction generates cation free radicals. Because of their high nonspecific oxidative capacity, laccases are useful for a wide range of biotechnological applications, which may be broadened with the use of laccase-mediator system.

Keywords: fungi, laccase, mediators, laccase-mediator system.

UVOD

Lakaze (Lac; EC 1.10.3.2.), benzendiol:kisik-oksidoreduktaze, uvrščamo v skupino polifenolnih oksidaznih encimov, ki v svojem katalitičnem centru vsebujejo atome bakra, zaradi česar jih imenujemo tudi (multi)bakrove oksidaze. Lakaze je že v 19. stoletju opisal japonski znanstvenik Yoshida (1883), ki je preučeval kemijsko sestavo rastlinskega soka drevesa *Rhus vernicifera*, kar pomeni, da so lakaze eni izmed najstarejših preučevanih encimov. Prisotne so pri rastlinah, glivah in bakterijah, odkrili pa so jih tudi pri insektih (Martinez in sod., 2005; Baldrian, 2006; Hoegger in sod., 2006; Sharma in Kuhad, 2008). Rastlinske lakaze sodelujejo v procesu sinteze lignina, glivne lakaze pa, ravno nasprotno, lignin v olesenelih celičnih stenah razgrajujejo. Poleg tega imajo glivne lakaze tudi številne druge vloge,

saj sodelujejo pri biosintezi pigmentov, morfogenezi, sporulaciji, odzivu na stres. Sposobne so tudi razgradnje toksičnih spojin, ki so strukturno podobne ligninu (Salomon in sod., 1996; Gianfreda in sod., 1999; Baldrian, 2006).

Lakaze katalizirajo oksidacijo substratov (najpogosteje fenolnih spojin) ob sočasni redukciji kisika do vode. Zaradi svoje relativno nizke substratne specifičnosti lahko oksidirajo širok nabor aromatskih substratov. Tako katalizirajo oksidacijo *orto*- in *para*-benzendiolov, aminofenolov, mono- in polifenolov, aromatskih aminov in ob prisotnosti kelatorjev tudi nekatere anorganske ione (na primer Mn^{2+} do Mn^{3+}) (Thurston, 1994; Yaropolov in sod., 1994; Morozova in sod., 2007; Giardina in sod., 2010; Majeau in sod., 2010). Pri enoelektronski oksidaciji substrata z lakazo nastane kationski prosti radikal (Thurston, 1994).

STRUKTURA IN DELOVANJE GLIVNIH LAKAZ

Velika večina glivnih lakaz je zunajceličnih monomernih globularnih beljakovin z molekulsko maso med približno 60 in 70 kDa in izoelektrično točko (pI) okoli vrednosti pH

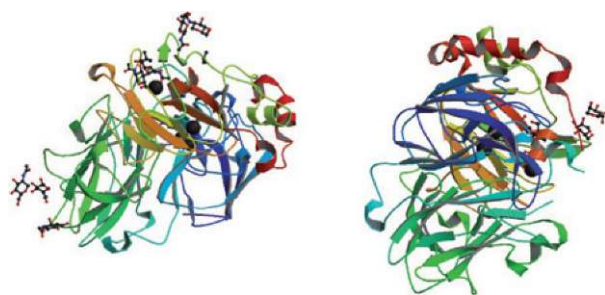
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101,
1000 Ljubljana, e-pošta: ajda.ulcnik@bf.uni-lj.si

¹Inštitut za lesarstvo in trajnostni razvoj, raziskovanje, razvoj, svetovanje in
izobraževanje d.o.o., Celovška cesta 268, 1000 Ljubljana

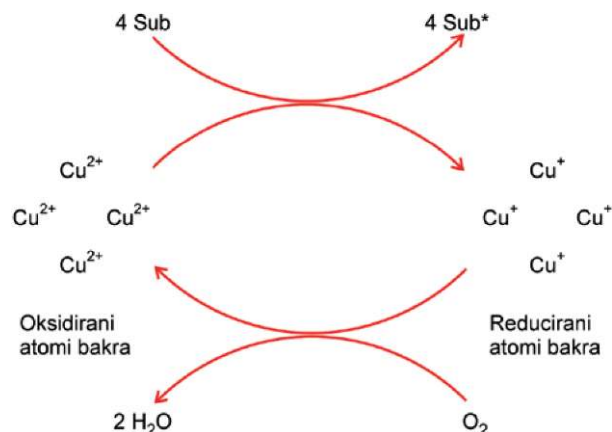
4. Navadno so glivne lakaze glikozilirane in vsebujejo med 10 in 25 odstotkov ogljikovih hidratov, katerih sestava je slabo raziskana (Thurston, 1994; Solomon in sod., 1996; Baldrian, 2006). Ogljikovi hidrati, vezani na lakazo, najverjetneje zagotavljajo konformacijsko stabilnost globularnega proteina ter obenem lakazo ščitijo pred proteolizo in inaktivacijo s prostimi radikali (Morozova in sod., 2007). Lakaze vsebujejo štiri atome bakra, ki se nahajajo na različnih mestih v strukturi encima in jih razvrščamo v tri skupine glede na njihove spektroskopske in elektronsko paramagnetne lastnosti (Duran in sod., 2002; Alcalde, 2007; Giardina in sod., 2010). Večina lakaz vsebuje po en bakrov ion tipa 1 (Cu1, na mestu T1) in tipa 2 (Cu2, na mestu T2) ter dva bakrova iona (Cu 3) tipa 3 (na mestu T3). Značilno modro barvo lakazam daje Cu1. Atomi bakra na mestih T2 in T3 so zelo blizu in skupaj tvorijo triatomski grozd.

Danes so znane kristalne strukture lakaz nekaterih gliv prostotrošnic, med drugim *Coprinopsis cinerea*, *Trametes versicolor*, *Rigidoporus lignosus*, *Lentinus tigrinus* in *Trametes trogii*, ter le ene zaprtotrošnice, *Melanocarpus albomyces* (Piontek in sod., 2002; Giardina in sod., 2010) (slika 1). Lakaze iz vseh omenjenih gliv so sestavljene iz treh domen. Cu1 se nahaja na domeni 2, triatomski grozd pa med domenama 1 in 3. Struktura lakaz je pri prostotrošnicah stabilizirana z dvema disulfidnima mostičkoma med domenama 1 in 3 ter domenama 1 in 2.

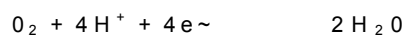
Kot že omenjeno, lakaze katalizirajo enoelektronsko oksidacijo substrata, pri čemer se bakrovi atomi reducirajo in nastanejo kationski radikali (Thurston, 1994; Yaropolov in sod., 1994). V prvotno stanje se encim povrne z redukcijo molekularnega kisika do vode (Hammel, 1997; Solomon in sod., 1999; Baldrian, 2006). Pri reakciji nastane iz ene molekule kisika dve molekuli vode, pri čemer se morajo do ustreznih radikalov oksidirati štiri molekule substrata (Riva, 2006) (sliki 2 in 3). Pri oksidaciji substrata se reducira Cu²⁺ na mestu T1, odvzeti elektron pa se preko visoko ohranjenega tripeptidnega zaporedja His-Cys-His, ki povezuje baker na mestu T1 z bakri v triatomskem grozdu,



Slika 1. Kristalna zgradba lakaze iz glive pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*, levo) in glive gnojiščna tintnica (*Coprinopsis cinerea*, desno) (www.pdb.org).



Slika 2. Katalitični cikel lakaz. Sub: molekula substrata, Sub•: prosti radikal substrata (prirejeno po Riva, 2006).



Slika 3. Redukcija molekularnega kisika do vode (prirejeno po Call in Mücke, 1997).

preneše na mesto T2/T3. Tam se zgodi redukcija molekularnega kisika, saj triatomski grozd služi kot vezavno mesto za kisik (Baldrian, 2006; Kilaru in sod., 2006; Alcalde, 2007). Pri reakciji nastali kationski prosti radikal lahko nato, odvisno od razmer v okolju, spontano polimerizira ali pa nadalje cepi vezi v organskem substratu (Alcalde, 2007; Giardina in sod., 2010). Lakaze na nek način delujejo kot baterije, saj shranjujejo elektrone, pridobljene s posameznimi enoelektronskimi oksidacijami substrata, ki jih nato porabijo za redukcijo molekularnega kisika. Natančen potek redukcije kisika kljub številnim raziskavam še vedno ni povsem razjasnen.

Tipični substrati lakaz so fenoli, saj so njihovi redoks potenciali dovolj nizki (od 0,5 V do 1 V), da Cu1 dopušča odvzem elektrona. Cu1 se nahaja v vdolbini encima, ki je dovolj široka za številne raznolike substrate, zaradi česar je Cu1 primeren akceptor elektronov (Giardina in sod., 2010).

Oksidacija substratov je odvisna od razlike njihovega redoks potenciala in redoks potenciala Cu1. Z naraščanjem vrednosti pH se standardni redukcijski potencial fenolov zniža, vendar pa je aktivnost lakaze pri visokih vrednostih pH zmanjšana, saj se na ione bakra v triatomskem grozdu veže hidroksidni anion (OH⁻), ki prepreči prenos elektrona z mesta T1 na T2/T3 (Baldrian, 2006). Tudi sicer različni anioni, kot so azidi, halidi, cianidi in tiocianidi, na podoben način močno inhibirajo delovanje lakaz (Gianfreda in sod., 1999; Alcalde, 2007).

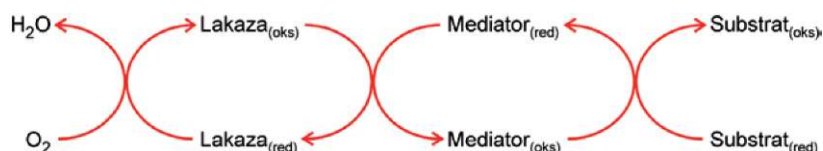
SISTEM LAKAZ IN MEDIATORJEV

Lignin je izredno heterogen in kompleksen polimer, sestavljen iz fenilpropanskih enot, ki so med seboj povezane z različnimi vezmi C-C in C-O. Dolgo časa je veljalo prepričanje, da razgradnjo lignina glivam bele trahnobe omogočajo lignin-peroksidaze in mangan-peroksidaze. Lignin-peroksidaze so namreč sposobne oksidirati tako fenolne kot nefenolne spojine, medtem ko lakaze same ne morejo oksidirati nefenolnih podenot lignina. Lakaze so, tako kot ostali encimi, prevelike, da bi prehajale v oleseno celično steno, zato je njihovo delovanje omejeno na površino olesene celične stene. Kljub temu pa glive bele trahnobe razgrajujejo lignin v notranjosti celične stene še preden je ta razkrojena do stopnje, pri kateri bi encimi lahko prodirali vanjo (Call in Mücke, 1997; Hammel, 1997). Takšen posreden razkroj olesene celične stene je možen z oksidacijami substratov z majhno relativno molekularno maso - mediatorjev (angl. *laccase mediator system*, LMS). Ti lahko prodirajo v lignocelulozni matriks in neodvisno od encima delujejo kot oksidanti. Mediatorji so uporabni tudi za oksidacijo substratov, ki imajo višji redoks potencial in jih lakaze same niso sposobne oksidirati. Lakaze imajo nizek redoks potencial (0,4 V do 0,8 V) v primerjavi z ligninolitičnimi peroksidazami (okoli 1 V) (Alcalde, 2007). Zaradi tega lahko neposredno oksidirajo

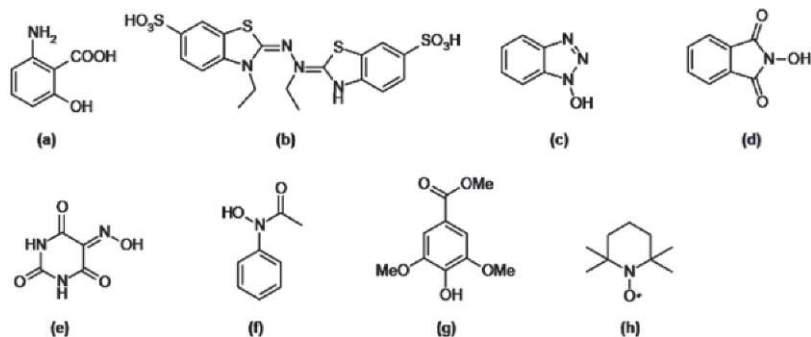
le fenolne spojine z nizkimi redoks potenciali, ne pa tudi obstojnih aromatskih spojin z višjimi redoks potenciali. Kljub temu so lakaze udeležene v njihovo razgradnjo, saj namreč oksidirajo mediatorje, ki pa nato delujejo kot difuzivni oksidanti. Ti lahko nato sami oksidirajo številne substrate, vključno z nefenolnimi spojinami in velikimi molekulami, kot je lignin (slika 4).

Vsi mediatorji so hkrati substrati lakaz in tvorijo reaktivne proste radikale, ki nato oksidirajo tudi bolj stabilne substrate. Učinkovit mediator lakaze mora imeti dovolj dolgo življenjsko dobo, da lahko difundira do substrata, in dovolj visok redoks potencial, da lahko dotični substrat tudi oksidira, obenem pa mora biti tudi sam ustrezen substrat za lakazo (Giardina in sod., 2010; Majeau in sod., 2010). Uporaba lakaznih mediatorjev je v preteklih letih dodatno razširila obseg uporabe lakaz, saj lahko s tem sistemom kataliziramo potek reakcij, katerih lakaze same niso sposobne katalizirati. Uporaba mediatorjev pa ima tudi slabosti, saj so mediatorji pogosto toksični, nestabilni in dragi, lahko pa tvorijo tudi stranske produkte, ki inaktivirajo encim (Alcalde, 2007; Majeau in sod., 2010).

Eden izmed prvih uporabljenih mediatorjev lakaze je bil ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)). Danes so v uporabi sintetični mediatorji tipa N-OH, kot so HBT (1-hidroksibenzotriazol), violuronska



Slika 4. Sistem oksidacije substrata z lakazo in mediatorji (prirejeno po Riva, 2006).



Slika 5. Mediatorji lakaz: (a) 3-hidroksiantranilna kislina (HAA); (b) 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (ABTS); (c) N-hidroksibenzotriazol (HBT); (d) N-hidroksiftaimid (HPI); (e) violuronska kislina (VLA); (f) N-hidroksiacetanilid (NHA); (g) metil ester 4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzojske kisline; (h) 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO) (prirejeno po Riva, 2006).

kislina, TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil) in N-hidroksiacetanilid, ki so najbolj povečali učinkovitost lakaze pri razgradnji lignina (Baldrian, 2006) (slika 5). Znano je, da kot mediatorji lakaz delujejo številne spojine, ki nastanejo pri razgradnji lignina. Naravni mediatorji lakaz so na primer anilin, siringaldehid, acetosiringon, vanilin in p-kumarična kislina (Baldrian, 2006; Majeau in sod., 2010).

IZRAŽANJE LAKAZ

Kot za vse druge snovi, glive za sintezo zunajceličnih encimov porabljajo energijo. Zaradi tega je izražanje genov, ki nosijo zapis za ligninolitične encime, regulirano s količino hranil v okolju. Omenjeni geni se večinoma izražajo v primeru, ko gliva na voljo nima dovolj hranil in mora kot vir energije oziroma ogljika uporabiti rastlinske polimere. Večina genov, ki kodirajo zapis za ligninolitične encime, se ob prisotnosti enostavno dostopnih virov ogljika, kot je glukoza, ne izraža (Aro in sod., 2005).

Geni za lakaze so edini izmed ligninolitičnih encimov, ki se v mnogih prostotrošnjicah v nizki ravni izražajo konstitutivno (glive nenehoma sintetizirajo lakaze v majhnih količinah neodvisno od dejavnikov v okolju, kar jim, ob ustreznih pogojih, omogoča začetek razgradnje lignina).

Sinteza lakaz je v veliki meri odvisna od količine hranil, razmer gojenja in razvojne stopnje, v kateri se gliva nahaja, prav tako pa lahko nanjo vplivajo določene kemijske spojine - induktorji. Ti na nastajanje lakaz vplivajo na nivoju transkripcije genov. Na indukcijo izražanja genov za lakaze tako vplivajo kovine, predvsem baker, pa tudi Cd^{2+} , Ag^{+} in Mn^{+} , in aromatske spojine, ki so strukturno podobne ligninu ali njegovim derivatom (2,5-ksilidin, ferulna ksilina, siringaldazin, veratril alkohol ...) (Cullen, 1997; Gianfreda in sod., 1999). Na sintezo lakaz močno vpliva tudi količina hranil v gojišču, predvsem dušika in ogljika. Vpliv dušika na izražanje lakaz je vprašljiv, saj so empirično dokazali večjo lakazno aktivnost tako v gojiščih s pomanjkanjem kot z zadostno količino vira dušika, na splošno pa naj bi dušik zaviral ekspresijo lakaz (Majeau in sod., 2010). Nasprotno pa je znano, da visoke koncentracije glukoze zavirajo transkripcijo genov za lakaze pri prostotrošnjicah (Baldrian, 2006; Giardina in sod., 2010; Majeau in sod., 2010). Povečanje lakazne aktivnosti se zgodi šele, ko koncentracija glukoze v gojišču pade in nastopi njeno pomanjkanje (Galhaup in sod., 2002).

V glivah je pogosto najti več različnih genov za lakaze in v skladu s tem je bilo pri številnih glivah opaženih več lakaznih izoencimov (Kilaru in sod., 2006). S čedalje večjim številom določenih nukleotidnih zaporedij genoma različnih vrst gliv pa so bolj dostopni tudi podatki o samih genih za lakaze. Tako so na primer ugotovili, da gene za lakazo vsebuje tudi gliva rjave trohnobe *Postia placenta* (Martinez in sod., 2009; Wei in sod., 2010). Domnevno glive potrebujejo več tipov lakaz zaradi različnih funkcij, ki jih te imajo v stopnji razvoja glive.

UPORABA LAKAZ V BIOTEHNOLOGIJI

Zaradi dokaj nespecifičnega delovanja so lakaze uporabne v mnogih biotehnoloških procesih. Lakaze so za takšne namene bolj primerne od ostalih glivnih ligninolitičnih encimov, na primer peroksidaz, ki za svoje delovanje potrebujejo vodikov peroksid, saj kot končni prejemnik elektronov uporabljajo kisik, ki je načeloma vedno prisoten v okolju. Lakaze lahko uporabljamo za številne namene: delignifikacijo papirne kaše, biobeljenje papirja, obdelavo industrijskih odpadnih vod, encimatsko modifikacijo vlaken in beljenje tekstila, encimsko odstranjevanje fenolnih spojin iz pijač ter kot biosenzorje ali biogorivne celice (Giardina in sod., 2010).

Z izrazoma tehnologija rekombinantne DNA ali genskim inženirstvom opisujemo uporabo različnih načinov in tehnik izolacije genov, njihovo spreminjanje in razvrščanje v nova zaporedja, njihov vnos in pomnoževanje v izbranih gostiteljskih celicah in tudi izražanje v obliki beljakovinskih produktov. Izražanje vnešenih genov v gostiteljskih celicah, ki sicer normalno teh genov ne vsebujejo, imenujemo heterologno izražanje ali heterologna ekspresija. Industrijska uporaba lakaz zahteva velike količine encima, ki jih lahko proizvedemo s tehnologijo rekombinantne DNA v ustreznih gostiteljskih celicah. Pri lakazah so to navadno nižje vrste gliv, kot je *Aspergillus*. Poročali so tudi o heterolognem izražanju lakaz v kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*, vendar pa ne poročajo, da bi s tem postopkom dosegli bistveno večje količine encima (Olempska-Beer, 2004; Alcalde, 2007; Majeau, 2010). Možno je, da raziskovalci podatkov o morebitnih uspešnih transformacijah zaradi poslovnih razlogov ne želijo javno objaviti. Ker na sintezo lakaz lahko vplivamo z dodajanjem induktorjev, je pridobivanje lakaz s heterologno ekspresijo primerna strategija za pridobivanje večjih količin encima. Pri tem je zelo pomembna izbira proizvodnega organizma, prav tako pa na izkoristke močno vpliva tudi celoten postopek proizvodnje, od sestave gojišča do postopkov ekstrakcije in čiščenja encimov. Glikozilacija glivnih lakaz je ena izmed večjih težav pri heterologni ekspresiji encima. Ker so lakaze večinoma zunajcelični encimi, je njihova izolacija preprosta, prav tako pa so lakaze v zunajceličnem okolju stabilne (Baldrian, 2006).

Tako lakaze kot tudi sistem lakaz in mediatorjev danes uporabljamo v različnih postopkih. Dansko podjetje Novozymes na primer proizvaja komercialne mešanice lakaze in mediatorja za beljenje tekstila (DeniLite®), obdelavo plute za plutovinaste zamaške (Suberase®) in delignifikacijo papirne kaše (Novozymes® 51003). Tudi sicer se številne raziskovalne skupine ukvarjajo z odstranjevanjem lignina iz papirne kaše, lakaze in mediatorje pa lahko uporabimo tudi za modifikacijo lignoceluloznih materialov, tako da pridobijo nove lastnosti. Poleg naštetega se lakaze uporabljajo tudi v prehrabni industriji, sintetični kemiji, kozmetični industriji ter za bioremediacijo (Couto in Herrera, 2006; Alcalde, 2007). Imobilizirane lakaze lahko v nanobiotehnologiji uporabljamo tudi kot biosenzorje za detekcijo fenolnih spojin, kisika ali azidov (Yaropolov in sod., 1994; Couto in Herrera, 2006).

Stroge okoljske zahteve, kot tudi predpisi za varovanje zdravja, so povzročili razvoj izdelovanja lesnih ploščnih kompozitov z manjšo vsebnostjo škodljivih ali dragih lepil ter nadomeščanje sintetičnih lepil z okolju bolj prijaznimi in bolj varnimi alternativami. Ena takšnih je tudi uporaba glivnih encimov pri lepljenju lesa, s čimer se izognemo

uporabi škodljivih sintetičnih lepil. Premreženje lesa lahko namesto z lepili dosežemo z radikalno reakcijo, ki jo povzročijo glivne oksidaze, predvsem lakaze. Prosti radikali na funkcionalnih skupinah lignina ob stiskanju in segrevanju omogočijo ponovno premreženje in nastanek ustreznega lepilnega sloja (Humar in Pohleven, 2005).

Okolju prijazne metode modificiranja površine lesa, papirne kaše in ostalih lignoceluloznih materialov z vezavo fenolov in drugih molekul z majhno relativno molekulsko maso omogoča encimska tehnologija. Uporaba lakaze na omenjenih substratih je omogočila mnoge izboljšave, kot so povečanje trdnosti papirja, mikrobnjo odpornost, povečano hidrofobnost, UV stabilnost in požarno zaščito, ki jih dosežemo z vezavo molekul z majhno relativno molekulsko maso na lignin (Widsten in sod., 2008). Narejenih je bilo že veliko raziskav, kjer so s pomočjo lakaze na lignocelulozne materiale vezali tehnični lignin in različne aromatske monomere ter modificirali površino tekstilnih vlaken z namenom vezave barvil ali doseganja bakterijske odpornosti (Lund in sod., 2001; Chandra in sod. 2002; Grönqvist in sod., 2006; Fackler in sod., 2008; Kudanga in sod., 2010).

SKLEP

Lakaze so nedvomno encimi, ki jih je in jih bo mogoče koristno uporabiti v industrijskih aplikacijah velikega obsega. V številnih biotehnoških procesih, v skladu z vse bolj prisotno zeleno tehnologijo, bodo lakaze predstavljale pomembno konkurenčno prednost podjetij, saj bo s prehodom na uporabo biotehnologije pomembno zmanjšan negativni vpliv njihovega delovanja na okolje. Poleg že sedaj široke palete aplikacij lakaze v industrijskih procesih, preučevanje povezanosti njihove strukture s funkcijo ter iskanje novih načinov uporabe še vedno predstavljajo dovolj velik izziv in zahtevajo visoko znanstveno odličnost. Kljub mnogim odkritjem pa lakaze, skriti potencial biotehnologije, še vedno predstavljajo izziv za uporabo v procesih, katerih koristi si še ne znamo predstavljati.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za finančno podporo v okviru programa P4-0015-0481 in projekta Biotehnoški procesi obdelave lignoceluloznih materialov L4-3641.

LITERATURA IN VIRI

- Alcalde M. (2007) Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications. V: Industrial Enzymes. Polaina J (Ur.), MacCabe AP (Ur.), Springer, Dordrecht, 461-476
- Aro N., Pakula T., Penttilä M. (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiology Reviews, 29: 719-739
- Baldrian P. (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews, 30: 215-242
- Call H.P., Mücke I. (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). Journal of Biotechnology, 53: 163-202
- Chandra R. P., Ragauskas A. J. (2002) Evaluating laccase - facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. Enzyme and Microbial Technology, 30: 855-861
- Couto S.R., Herrera J.L.T. (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnology Advances, 24: 500-513
- Cullen D. (1997) Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. Journal of Biotechnology, 53: 273-289
- Duran N., Rosa M.A., D'Annibale A., Gianfreda L. (2002) Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and Microbial Technology, 31: 907-931
- Fackler K, Kuncinger T, Ters T, Srebotnik E. (2008) Laccase-catalyzed functionalization with 4-hydroxy-3-methoxybenzylurea significantly improves internal bond of particle boards. Holzforschung, 62: 223-229
- Galhaup C., Wagner H., Hintertstoisser B., Haltrich D. (2002) Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. Enzyme and Microbial Technology, 30: 529-536
- Gianfreda L., Xu F., Bollag J.M. (1999) Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediation Journal, 3: 1-26
- Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G. (2010) Laccases: a never-ending story. Cellular and Molecular Life Sciences, 67: 369-385
- Grönqvist S., Rantanen K, Alén R, Mattinen M-L, Buchert J, Viikari L. (2006) Laccase catalysed functionalization of TMP with tyramine. Holzforschung, 60: 503-508
- Hammel K.E. (1997) Fungal Degradation of Lignin. V: Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition. Cadisch G (Ur.), Giller KE (Ur.), CAB International, Madison (MI), 33-45
- Hoegger P.J., Kilaru S., James T.Y., Thacker J.R., Kües U. (2006) Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. FEBS Journal, 273: 2308-2326
- Humar M., Pohleven F. (2005) Biotehnologija v lesarstvu. Les, 57: 316-321
- Kilaru S., Hoegger P.J., Kües U. (2006) The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. Current Genetics, 50: 45-60
- Kudanga T., Prasetyo E.N., Widsten P., Kundelbauer A., Jury S., Heathcote C., Sipila J., Weber H., Nyanhongo G. S., Guebitz G.M. (2010) Laccase catalyzed covalent coupling of fluorophenols increases lignocellulose surface hydrophobicity. Bioresource Technology, 101: 2793-2799
- Lund M., Ragauskas A.J. (2001) Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water soluble phenols. Applied Microbiology and Biotechnology, 55: 699-703
- Majeau J.A., Brar S., Tyafi R.D. (2010) Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. Bioresource Technology, 10: 2331-2350
- Martfnez A.T., Speranza M., Ruiz-Duenas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martfnez M.J., Gutiérrez A., del Rfo J.C. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International Microbiology, 8: 195-204
- Martinez D., Challacombe J., Morgenstern I., Hibbett D.,

- Schmoll M., Kubicek C.P., Ferreira P., Ruiz-Duenas F.J., Martinez A.T., Kersten P., Hammel K.E., Vanden Wymelenberg A., Gaskell J., Lindquist E., Sabat G., Bondurant S.S., Larrondo L.F., Canessa P., Vicuna R., Yadav J., Doddapaneni H., Subramanian V., Pisabarro A.G., Lavfn J.L., Oguiza J.A., Master E., Henrissat B., Coutinho P.M., Harris P., Magnuson J.K., Baker S.E., Bruno K., Kenealy W., Hoegger P.J., Kües U., Ramaiya P., Lucas S., Salamov A., Shapiro H., Tu H., Chee C.L., Misra M., Xie G., Teter S., Yaver D., James T., Mokrejs M., Pospisek M., Grigoriev I.V., Brettin T., Rokhsar D., Berka R., Cullen D. (2009) Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postiaplacentia* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106: 1954-1959
23. Morozova O.V., Shumakovich G.P., Shleev S.V., Yaropolov Ya.I. (2007) Laccase-mediator systems and their applications: a review. Applied Biochemistry and Microbiology, 43: 583-597
 24. Olempska-Beer Z. (2004) Laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*. Chemical and Technical Assessment (CTA). FAO, 61st JECFA: 1-6
 25. PDB. (2010) RSCB Protein Data Bank. <http://www.pdb.org/pdb/results/results.do?gotopage=2&qrid=95DE95A&tabto show=Curent> (1.12.2010)
 26. Piontek K., Antorini M., Choinowski T. (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1,90-Å resolution containing a full complement of coppers. The journal of biological chemistry, 277: 37663-37669
 27. Riva S. (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. Trends in Biotechnology, 24: 219-226
 28. Sharma K.K. in Kuhad R.C. (2008) Laccase: enzyme revisited and function redefined. Indian Journal of Microbiology, 48: 309-316
 29. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. Chemical Reviews, 96: 2563-2605
 30. Thurston C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases. Microbiology, 140:19-26
 31. Wei D., Houtman C.J., Kapich A.N., Hunt G.G., Cullen D., Hammel K.E. (2010) Laccase and its role in production of extracellular reactive oxygen species during wood decay by the brown rot basidiomycete *Postia placenta*. Applied and Environmental Microbiology, 76: 2091-2097
 32. Widsten P., Kandelbauer A. (2008) Laccase application in the forest products industry: a review. Enzyme and Microbial Technology, 42:293-307
 33. Yaropolov A.I., Skorobogatko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeyev S.D. (1994) Laccase: properties, catalytic mechanism and applicability. Applied Biochemistry and Biotechnology, 49: 257-280
 34. Yoshida H. (1883) Chemistry of lacquer (urushi). Part I. Journal of Chemical Society, 43: 472-486