

С. А. Колобова (преп.), А. Н. Скорняков (асп.), Н. И. Петухова (к. биол. н., доц.),
В. Э. Алексеева (студ.), Л. Х. Халимова (к.т.н., доц.),
В. В. Зорин (чл.-корр. АН РБ, д.х.н., проф., зав. каф.)

ОКИСЛЕНИЕ ПИРОКАТЕХИНА С ПОМОЩЬЮ БИОКОМПОЗИТА НА ОСНОВЕ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Уфимский государственный нефтяной технический университет,
кафедра биохимии и технологии микробиологических производств
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1; e-mail: kulemza92@mail.ru

S. A. Kolobova, A. N. Skorniakov, N. I. Petukhova, V. E. Alekseeva, L. Kh. Khalimova, V. V. Zorin

CATECHOL OXIDATION BY THE BIOCOMPOSITE BASED ON BACTERIAL CELLULOSE AND SPORE-FORMING BACTERIA

Ufa State Petroleum Technological University
1, Kosmonavtov Str., 450064, Ufa, Russia; e-mail: kulemza92@mail.ru

Найдена культура спорообразующих бактерий *Bacillus sp.* BH4-2, проявляющая лакказную активность в отношении синингалдазина. Установлено, что лакказная активность культуры коррелирует со спорообразованием бактерий. Обнаружено, что споры бактерий в оптимальных условиях (pH 7.6 и 60°C) катализируют процесс полимеризации пирокатехина. На основе спор *Bacillus sp.* BH4-2 и бактериальной целлюлозы разработан биоккомпозит с лакказной активностью. Полимеризация пирокатехина в присутствии биоккомпозита протекает более эффективно, чем с использованием суспензии спор *Bacillus sp.* BH4-2. Показана возможность многократного использования биоккомпозита.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза; биоккатализ; иммобилизация; лакказа; пирокатехин; полимеризация.

Лакказы (бензендиол:кислород оксидоредуктазы, ЕС 1.10.3.2) способны катализировать окисление большого спектра химических соединений (фенолы, *p*- и *o*-дифенолы, полифенолы, ароматические амины и полиамины, тиофенолы и др.) молекулярным кислородом¹⁻⁵. Благодаря своей широкой субстратной специфичности, а также способности работать как в мягких, так и экстремальных условиях, лакказы нашли применение в различных промышленных процессах, таких как биодегградация ксенобиотиков, отбелива-

New spore-forming bacterium *Bacillus sp.* BH4-2 with laccase activity towards syringaldazine was found. A correlation between laccase activity and sporulation rate is established. It is found that in optimal conditions (pH 7.6, temperature 60 °C) bacterial spores catalyze catechol polymerization. A biocomposite material showing laccase activity based on bacterial cellulose combined with *Bacillus sp.* BH4-2 spores was designed. It is found that catechol polymerization provided by the biocomposite is more effective than by the spore suspension. The possibility of multiple reuse of the biocomposite was shown.

Key words: bacterial cellulose; biocatalysis catechol; immobilization; laccase; polymerization.

ние и окрашивание тканей, приготовление пищевых продуктов, синтез биологически активных веществ, производство красителей, электропроводящих полимеров¹⁻⁶.

Особый интерес вызывает способность лакказ осуществлять окислительную полимеризацию органических соединений⁷⁻¹². Такие процессы могут быть использованы в очистке сточных вод от токсичных соединений, поскольку образующиеся олигомеры и полимеры, как правило, менее токсичны по сравнению с мономерами, и их можно легко удалить путем фильтрования или осаждения⁸. Кроме того, с помощью лакказ мож-

Дата поступления 23.09.23

но синтезировать практически важные полимеры, обладающие антиоксидантной активностью, антимикробным действием, электропроводностью, способные служить носителем для адресной доставки лекарственных соединений^{6, 9–12}.

Показано, что полимеризация наиболее эффективно протекает с участием лакказ, иммобилизованных на носителях, которые стабилизируют активность фермента, а также контролируют региоселективность процесса, влияют на молекулярную массу и степень разветвленности продуктов^{7, 9}. Примечательно также, что с помощью иммобилизованной лакказы можно осуществлять модификацию самого носителя (биографтинг), улучшая или придавая ему новые свойства^{9, 12}.

В качестве перспективного носителя для иммобилизации лакказ рассматривается бактериальная целлюлоза – природный полимер, применение которого в области создания смарт-материалов¹ в настоящее время активно исследуется³. В частности, на основе бактериальной целлюлозы разрабатываются энзиматически активные композиты (биокатализаторы), содержащие клетки или ферменты микроорганизмов^{6, 14–18}. Показано, что иммобилизацией лакказ на бактериальной целлюлозе могут быть получены биокатализаторы для деградации синтетических красителей¹⁸, полимеризации органических соединений⁶.

Следует отметить, что большинство упомянутых выше работ в области полимеризации органических соединений выполнено с использованием препаратов грибных лакказ, которые зачастую характеризуются низкой стабильностью при высокой температуре и повышенных значениях pH среды, что ограничивает их применение в условиях промышленного производства¹⁹. Вместе с тем, известно, что лакказы, локализованные на поверхности спор бактерий рода *Bacillus*, отличаются высокой термостабильностью, галорезистентностью, устойчивостью к органическим растворителям и другим физико-химическим факторам^{19, 20}. Учитывая также, что производство ферментных препаратов экономически более затратно по сравнению с получением биомассы микроорганизмов, актуальным является изучение возможности применения спор бацилл, иммобилизованных в бактериальной целлюлозе, в процессах полимеризации фенолов.

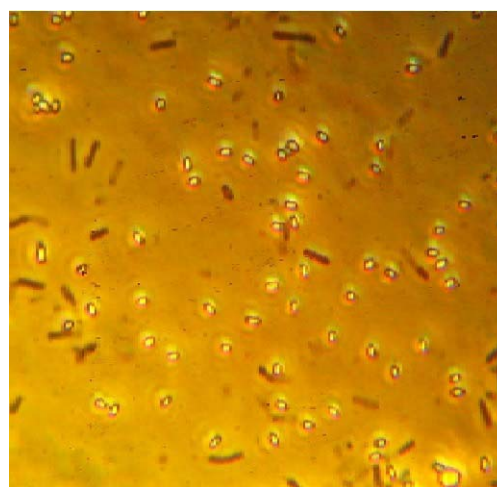
Целью данной работы явилось получение иммобилизованного биокомпозита с лакказной активностью на основе спор *Bacillus sp.* ВН4-2 и гель-пленки бактериальной целлюлозы, а также исследование возможности его применения для полимеризации пирокатехина.

В качестве продуцента лакказы была использована спорообразующая культура *Bacillus sp.* ВН4-2,

выделенная из сточных вод нефтехимического предприятия (рис. 1).



а



б

Рис. 1. Морфология колоний (а) и клеток со спорами (б) культуры *Bacillus sp.* ВН4-2

Исследование трансформации сиригальдазина (специфического субстрата лакказ²¹) с помощью биомассы различного возраста показало наличие лакказной активности у клеток культуры *Bacillus sp.* ВН4-2 (рис. 2).

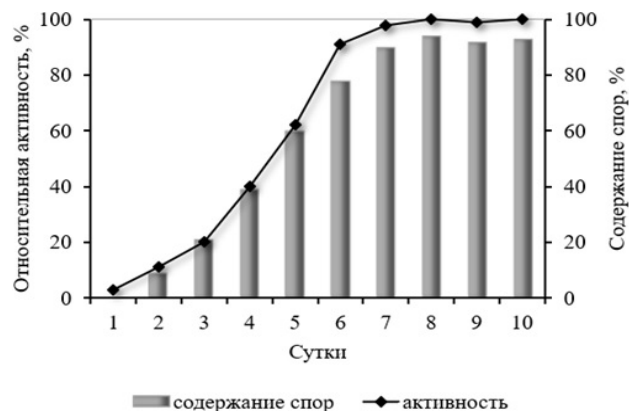


Рис. 2. Динамика спорообразования и изменения лакказной активности биомассы бактерий *Bacillus sp.* ВН4-2 при росте на агаризованной среде

Установлено, что изменение лакказной активности биомассы в зависимости от продолжительности культивирования коррелирует с процессом спорообразования (рис. 2). В молодых культурах с низким содержанием спор скорость окисления субстрата очень низкая. В старых культурах, состоящих на 93–97 % из спор, окислительная активность биомассы достигает максимального значения. Это показывает, что споры бактерий *Bacillus sp.* ВН4-2 обладают лакказной активностью.

С целью подбора оптимальных условий для лакказной активности спор *Bacillus sp.* ВН4-2 было исследовано влияние температуры и кислотности среды на окисление сиригальдазина в присутствии биомассы десятисуточной культуры. Было обнаружено, что наиболее активно реакция протекает при 60 °С и pH 7.6 (рис. 3).

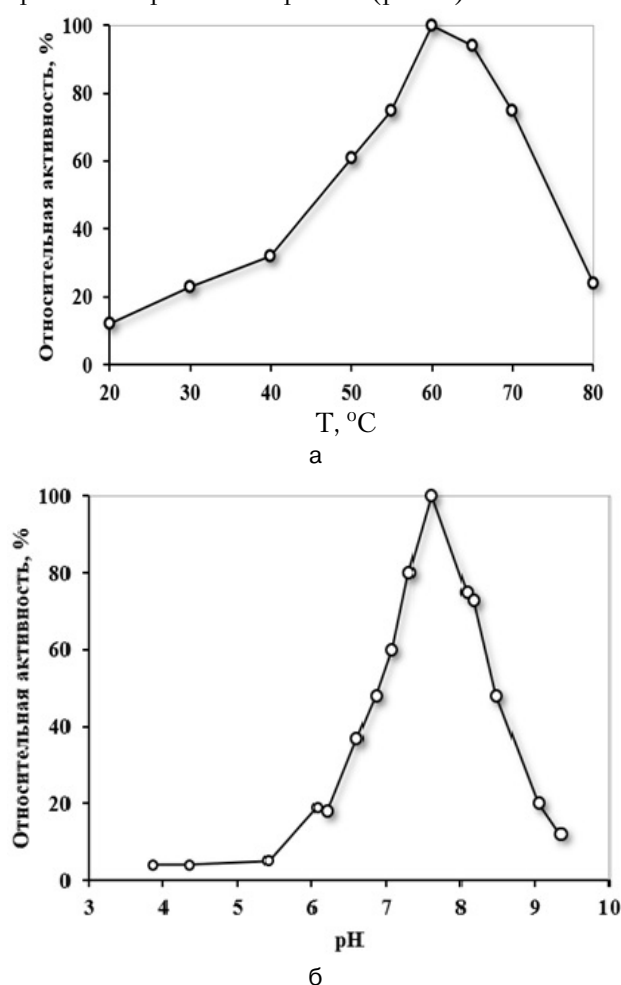


Рис. 3. Зависимость лакказной активности суспензии спор *Bacillus sp.* ВН4-2: а – от температуры; б – кислотности среды

Десятисуточная культура *Bacillus sp.* ВН4-2 была протестирована на способность к полимеризации пирокатехина в подобранных условиях (60 °С и pH 7.6). Биомассу бактерий в концентрации 200 мг/мл (по сырому весу) вносили в 0.05 М фосфатный буфер, содержащий 2 г/л пирокатехи-

на, и инкубировали при интенсивном перемешивании. За ходом реакции следили по изменению УФ и видимой области спектров образцов супернатантов реакционной смеси, а также по появлению в ней окрашенных продуктов полимеризации^{22, 24–26}.

Известно, что под действием лакказы происходит одноэлектронное окисление пирокатехина с образованием радикала *o*-бензосемихинона^{1, 7, 22–26}, который путем последующего ферментативного окисления или некаталитического диспропорционирования может превращаться в *o*-бензохинон^{1, 22, 23}, а также может вовлекаться в реакции некаталитической полимеризации (совместно с исходным субстратом или образовавшимся хиноном), образуя димеры, олигомеры и полимеры, в которых мономеры могут быть соединены между собой с помощью С–С или С–О–С связей²². Со временем полимерные продукты осаждаются в виде осадка темно-коричневого или черного цвета^{22, 24–26}.

Сообщается²², что в процессе трансформации пирокатехина с помощью лакказы гриба *Trametes versicolor* на спектрах в ультрафиолетовой области появляется хорошо выраженный пик при 410 нм, соответствующий *o*-бензохинону. Пик почти линейно увеличивался в течение первых 3 ч реакции и исчез только через 24 ч, как полагают, вследствие полимеризации хинона²². Появление пика при 408–410 нм отмечалось также при трансформации пирокатехина в присутствии ферментов грибов *Aspergillus nidulans*²⁴ и *Myceliophthora thermophila*^{25, 26}. Однако в случае лакказы *Myceliophthora thermophila* пик, соответствующий *o*-бензохинону, был небольшим и наблюдался только в начале реакции^{25, 26}.

Исследование трансформации пирокатехина с помощью суспензии спор *Bacillus sp.* ВН4-2 методом УФ-видимой спектроскопии показало увеличение полосы поглощения при 410 нм в ходе реакции, однако пик, соответствующий *o*-бензохинону, не образуется (рис. 4). Возможно, он небольшой и маскируется другими соединениями, образующимися в ходе реакции.

Вместе с тем было выявлено, что пик поглощения, увеличивающийся в ходе реакции, находится в более коротковолновой области ультрафиолетовой части спектра (315–330 нм, рис. 4). Кроме того, в конце трансформации появляется пик при 360–380 нм. Полученные данные согласуются с представленными в литературе результатами исследования полимеризации пирокатехина с помощью лакказы гриба *Myceliophthora thermophila*, для которой также было выявлено значительное увеличение поглощения в области около 300 нм (315 и 365 нм)²⁶. Аналогия прослеживается также и в видимой части спектра. В обоих случаях на-

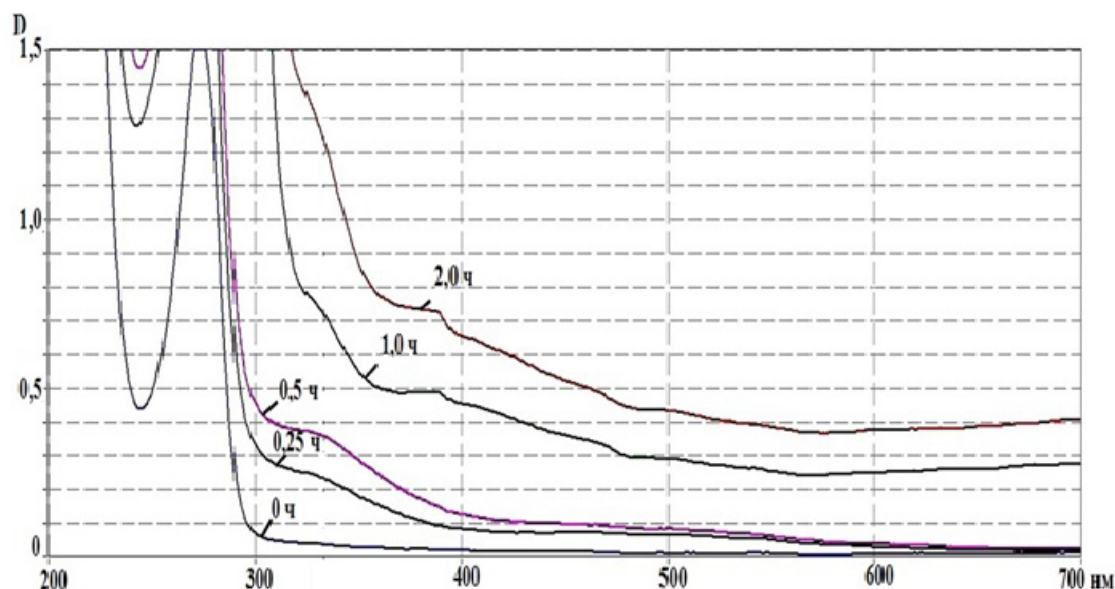


Рис. 4. УФ-видимые спектры поглощения субстрата и промежуточных продуктов при трансформации пирокатехина с помощью суспензии спор бактерий *Bacillus sp.* ВН4-2

блюдается увеличение интенсивности поглощения во всем диапазоне длин волн (от 450 до 700 нм), что, как полагают, связано с появлением окрашенных продуктов²⁶. В пользу такого предположения свидетельствует развитие окраски от бесцветного к коричневому цвету реакционной смеси со спорами бактерий *Bacillus sp.* ВН4-2 в ходе реакции.

Установлено также, что, как и в случае грибных лакказ^{22, 24-26}, при использовании спор *Bacillus sp.* ВН4-2 образуются нерастворимые в воде продукты, выпадающие в виде осадка черного цвета.

Таким образом, полученные результаты показывают, что споры бактерий *Bacillus sp.* ВН4-2 с лакказной активностью способны катализировать полимеризацию пирокатехина. Это делает перспективной разработку иммобилизованного биокатализатора с целью многократного использования спор бактерий.

Следует отметить, что успешные попытки иммобилизации бацилл на бактериальной целлюлозе уже предпринимались ранее²⁷, однако вопросы, связанные с использованием полученного биокомпозита для трансформации органических соединений, еще не изучались.

Для получения биокомпозита очищенную пленку бактериальной целлюлозы, предварительно пропитанную питательной средой, инокулировали культурой бактерий *Bacillus sp.* ВН4-2 и культивировали при 30 °С для увеличения численности микроорганизмов и формирования спор. Спорообразование контролировали в гидролизатах пленок, полученных с помощью целлюлолитического препарата *Целлюлюкс F*. Для полимеризации пирокатехина использовали биокомпо-

зит с выходом спор не менее 90%. В качестве контроля использовали гель-пленку целлюлозы без микроорганизмов и суспензию спор без целлюлозы.

В результате исследования динамики изменения поглощения при 320 нм было обнаружено, что в присутствии только бактериальной целлюлозы без клеток происходит медленное окисление пирокатехина (рис. 5). Использование суспензии спор или биокомпозита значительно ускоряют процесс, причем в присутствии биокомпозита достигается наибольшая скорость трансформации пирокатехина (рис. 5, 1 цикл). В присутствии суспензии спор пик поглощения увеличивается монотонно на протяжении всей реакции, тогда как при использовании биокомпозита после 1,5 ч происходит снижение поглощения, сопровождающееся изменением окраски среды от бесцветной до коричневой, что указывает на дальнейшее превращение промежуточного продукта.

Установлено, что биокомпозит может быть использован повторно для трансформации пирокатехина, по крайней мере, в течение 8 циклов. При этом скорость накопления продукта, характеризующегося максимумом поглощения в области 320 нм, увеличивается в последующих циклах, достигая максимального значения в течение 1 ч (рис. 5).

Обнаружено, что продукты полимеризации пирокатехина сорбируются пленкой бактериальной целлюлозы. После второго цикла гель-пленка целлюлозы становится коричневой, а после восьмого — черной (рис. 6).

Сравнение УФ-видимых спектров поглощения жидкой фракции двухчасовых образцов, полученных после первого и восьмого цикла трансформации, показало существенное увеличение

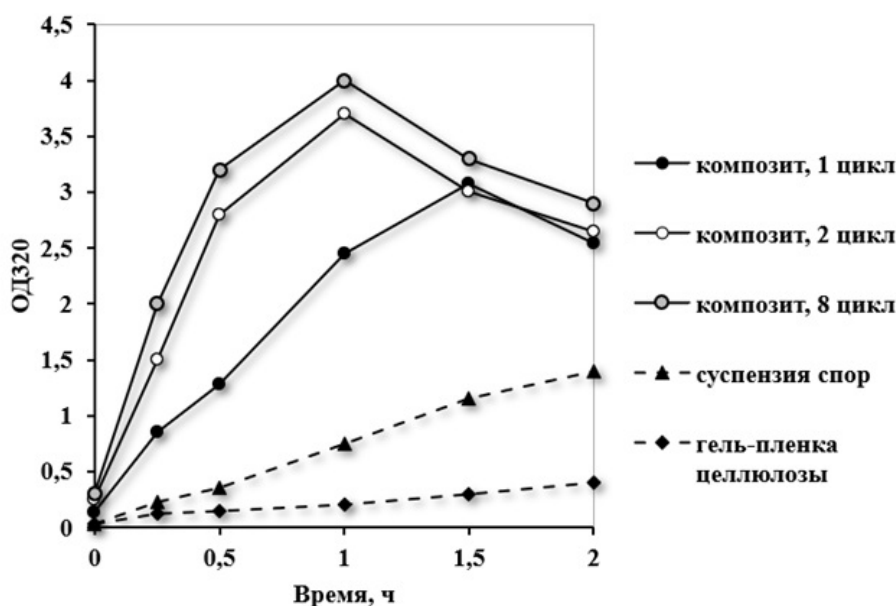


Рис. 5. Динамика оптической плотности образцов при 320 нм, отобранных в процессе окисления пирокатехина с помощью биоконкомпозита и суспензии спор бактерий *Bacillus sp.* ВН4-2



а



б



в

Рис. 6. Фотографии биоконкомпозита: а – перед трансформацией; б – после второго; в – после восьмого цикла трансформации пирокатехина

сигнала в области 400–700 нм и появление пика при 400 нм после многократного использования биоконкомпозита (рис. 7).

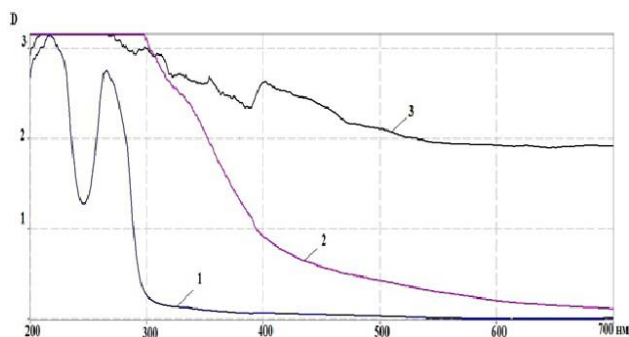


Рис. 7. УФ-видимый спектр субстрата (1) и продуктов после первого (2) и восьмого (3) цикла трансформации пирокатехина в присутствии биоконкомпозита

Можно полагать, что это различие может быть связано с разными скоростями образования или дальнейшего превращения промежуточных продуктов в первом и восьмом циклах. Однако нельзя исключить, что в первом цикле полимеризации промежуточные продукты сорбируются гель-пленкой целлюлозы более эффективно, чем после ее многократного использования.

Таким образом, показана перспективность использования иммобилизованных на бактериальной целлюлозе спор бактерий *Bacillus sp.* ВН4-2 с лакказной активностью в качестве биокатализатора окислительной полимеризации пирокатехина. Для установления состава полученных продуктов полимеризации требуются дополнительные исследования.

Полученные результаты могут представлять интерес для разработки методов очистки стоков от токсичного пирокатехина, который широко ис-

пользуется при производстве резины, красителей, пестицидов, пластиков, лекарственных и косметических средств²⁸.

Экспериментальная часть

В работе использовали спорообразующие бактерии *Bacillus sp.* ВН4-2 и уксуснокислые бактерии *Komagataeibacter sp.* НЦ-13 из рабочей коллекции культур микроорганизмов кафедры биохимии и технологии микробиологических производств УГНТУ.

Бактерии *Bacillus sp.* ВН4-2 выращивали на плотной питательной среде, содержащей панкреатический гидролизат рыбной муки и 1.5% агара. Уксуснокислые бактерии культивировали на среде Хестрина-Шрамма (глюкоза – 2%, пептон – 0.5%, дрожжевой экстракт – 0.5%, натрий фосфорнокислый двузамещенный – 0.27%, лимонная кислота – 0.15%)²⁹, содержащей 1% этанола. Питательные среды стерилизовали в автоклаве в течение 30 мин при температуре 120 °С.

Для исследования спорообразования и лакказной активности культуры *Bacillus sp.* ВН4-2 готовили суспензию микроорганизмов из биомассы, собранной с поверхности агаризованной питательной среды. Количество спор и вегетативных клеток бактерий в суспензии оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии. Содержание спор определяли по процентному соотношению количества спор от общего количества клеток. Лакказную активность суспензии спор *Bacillus sp.* ВН4-2 определяли при 55 °С с использованием синингалдазина в качестве субстрата. Окисление синингалдазина контролировали спектрофотометрически на спектрофотометре (СФ-2200, Россия), измеряя увеличение поглощения при 525 нм в течение 5 мин. Реакционная смесь (3 мл) содержала 100 мкл споровой суспензии (20 мг влажной биомассы), 2.4 мл фосфатного буфера (0.1 М, рН 7) и 0.5 мл раствора синингалдазина (0.5 мМ). Одна единица активности суспензии спор была определена как количество фермента, необходимое для окисления 1 моля субстрата в минуту. Влияние показателя рН на лакказную активность суспензии спор *Bacillus sp.* ВН4-2 определяли в диапазоне рН 3.8–9.4 с использованием синингалдазина в качестве субстрата в 0.1 М цитратном буфере (рН 3.8–6.4), фосфатном буфере (рН 6.0–8.0) и боратном буфере (рН 8.0–9.4) при температуре 55 °С. Оптимальную температуру исследовали в диапазоне температур от 20 до 70 °С при оптимальном значении рН 7.6.

Исследование трансформации пирокатехина с помощью суспензии спор *Bacillus sp.* ВН4-2 осуществляли при 60 °С в 0.05 М фосфатном буфере (рН 7.6). Биомассу семисуточной культуры бактерий в концентрации 200 мг/мл (по сырому весу) вносили в фосфатный буфер, содержащий 2 г/л пирокатехина, и инкубировали при интенсивном перемешивании. УФ-видимые спектры продуктов окисления субстрата записывали на спектрофотометре (СФ-2200, Россия). Образование окрашенных продуктов полимеризации субстрата оценивали визуально.

Биосинтез целлюлозы проводили в процессе культивирования уксуснокислых бактерий *Komagataeibacter sp.* НЦ-13 в статических условиях при 30 °С в колбах емкостью 250 мл, содержащих 100 мл среды Хестрина-Шрамма с 1% этанола, в течение 12 сут. По окончании синтеза пленки полимера извлекали из культуральной жидкости, промывали дистиллированной водой и помещали в 0.5 М раствор NaOH для разрушения клеток продуцента, которое осуществляли в автоклаве при температуре 121 °С в течение 30 мин. Затем полимерные пленки промывали дистиллированной водой и использовали для иммобилизации бактерий *Bacillus sp.* ВН4-2.

Для получения биоконкомпозита 1 мл суспензии клеток *Bacillus sp.* ВН4-2 наносили на поверхность гель-пленки бактериальной целлюлозы, пропитанной жидкой питательной средой для культивирования бацилл (10 мл), и выращивали культуру спорообразующих бактерий при 30 °С в течение 10 сут. О ходе спорулирования культуры судили по содержанию спор в суспензии клеток, полученной после гидролиза целлюлозы с помощью ферментного препарата *Целлолюкс F* (НПО «Сиббиофарм», Россия).

Для трансформации пирокатехина использовали пленки целлюлозы массой около 7 г, в которых содержание спор составляло не менее 90% от общего количества клеток. Трансформацию проводили при 60 °С в 20 мл фосфатного буфера (0.05 М, рН 7.6), содержащем 2 г/л пирокатехина, при интенсивном перемешивании. При повторном использовании биокатализатора жидкую фазу после окончания предыдущего цикла заменяли на свежий буфер, содержащий 2 г/л пирокатехина.

Все эксперименты проводили в трех повторностях. Полученные данные обрабатывали с использованием компьютерной программы MS Excel. Стандартное отклонение не превышало 5% от средних значений.

Литература

1. Cannatelli M. D., Ragauskas A. J. Two decades of laccases: advancing sustainability in the chemical industry // *Chem. Rec.*– 2017.– V.17, №1.– Pp.122-140.
2. Cardullo N., Muccilli V., Tringali C. Laccase-mediated synthesis of bioactive natural products and their analogues // *RSC Chem. Biol.*– 2022.– V.3, №6.– Pp.614-647.
3. Bassanini I., Ferrandi E. E., Riva S., Monti D. Biocatalysis with laccases: an updated overview // *Catalysts*.– 2020.– V.11, №7 (26).– Pp.1-30.
4. Galazka A., Jankiewicz U., Szczepkowski A. Biochemical characteristics of laccases and their practical application in the removal of xenobiotics from water // *App. Sci.*– 2023.– V.13, №7 (4394).– Pp.1-43.
5. Sondhi S., Chopra N. K., Kumar A., Gupta N. Laccase: A green solution for environmental problems // *Adv. Environ Eng Res.*– 2023.– V.4, №2 (030).– Pp.1-32.
6. Shim E., Su J., Noro J., Teixeira M. A., Cavaco-Paulo A., Silva C., Kim H. R. Conductive bacterial cellulose by in situ laccase polymerization of aniline // *PLoS One*.– 2019.– V.14, №4 (E02145464).– Pp.1-14.
7. Su J., Fu J., Wang Q., Silva C., Cavaco-Paulo A. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of polyphenols // *Crit Rev Biotechnol.*– 2018.– V.38, №2.– Pp.294-307.
8. Zhang F., Lian M., Alhadhrami A., Huang M., Li B., Mersal G. A. M., Ibrahim M. M., Xu M. Laccase immobilized on functionalized cellulose nanofiber/alginate composite hydrogel for efficient bisphenol A degradation from polluted water // *Adv Compos Hybrid Mater.*– 2022.– V.5.– Pp.1852-1864.
9. Nagarajan S., Nagarajan R., Kumar J., Salemme A., Togni A. R., Saso L., Bruno F. Antioxidant activity of synthetic polymers of phenolic compounds // *Polymers*.– 2020.– V.12, №1646.– Pp.1-27.
10. Latos-Brozio M., Masek A., Piotrowska M. Polymeric forms of plant flavonoids obtained by enzymatic reactions // *Molecules*.– 2022.– V.27, №3702.– Pp.1-27.
11. Su J., Noro J., Silva S., Fu J., Wang Q., Ribeiro A., Silva C., Cavaco-Paulo A. Antimicrobial coating of textiles by laccase *in situ* polymerization of catechol and *p*-phenylenediamine // *Reactive and Functional Polymers*.– 2019.– V.136.– Pp.25-33.
12. Slagman S., Zuilhof H., Franssen M. C. R. Laccase-mediated grafting on biopolymers and synthetic polymers: a critical review // *ChemBioChem*.– 2018.– V.19, №4.– Pp.288-311.
13. Gregory D. A., Tripathi L., Fricker A. T., Asare E., Orlando I., Raghavendran V., Roy I. Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications // *Materials Science and Engineering: R: Reports*.– 2021.– V.145, 100623.– Pp.1-27.
14. Gilbert C., Tang T. C., Ott W., Dorr B. A., Shaw W. M., Sun G. L., Ellis T. Living materials with programmable functionalities grown from engineered microbial co-cultures // *Nature materials*.– 2021.– V.20, №5.– Pp.691-700.
15. Колобова С. А., Назмутдинов Д. З., Петухова Н. И. Бактериальная целлюлоза – перспективный материал для иммобилизации микроорганизмов-деструкторов фенола // *Баш. хим. ж.*– 2019.– Т.26, №1.– С.105-111.

References

1. Cannatelli M. D., Ragauskas A. J. [Two Decades of Laccases: Advancing Sustainability in the Chemical Industry]. *Chem. Rec.*, 2017, vol.1, pp.122-140.
2. Cardullo N., Muccilli V., Tringali C. [Laccase-mediated synthesis of bioactive natural products and their analogues]. *RSC Chem. Biol.*, 2022, vol.3, pp.614-647.
3. Bassanini I., Ferrandi E. E., Riva S., Monti D. [Biocatalysis with laccases: An updated overview]. *Catalysts*, 2020, vol.11, no.7(26), pp.1-30.
4. Galazka A., Jankiewicz U., Szczepkowski A. [Biochemical Characteristics of Laccases and Their Practical Application in the Removal of Xenobiotics from Water]. *Applied Sciences*, 2023, vol.13, no.7 (4394), pp.1-43.
5. Sondhi S., Chopra N. K., Kumar A., Gupta N. [Laccase: A green solution for environmental problems]. *Adv. Environ Eng Res.*, 2023, vol.4, no.2 (030), pp.1-32.
6. Shim E., Su J., Noro J., Teixeira M. A., Cavaco-Paulo A., Silva C., Kim H. R. [Conductive bacterial cellulose by in situ laccase polymerization of aniline]. *PLoS One*, 2019, vol.14, no.4 (E02145464), pp.1-14.
7. Su J., Fu J., Wang Q., Silva C., Cavaco-Paulo A. [Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of polyphenols]. *Crit Rev Biotechnol.*, 2018, vol.38, no.2, pp.294-307.
8. Zhang F., Lian M., Alhadhrami A., Huang M., Li B., Mersal G. A. M., Ibrahim M. M., Xu M. [Laccase immobilized on functionalized cellulose nanofiber/alginate composite hydrogel for efficient bisphenol A degradation from polluted water]. *Adv Compos Hybrid Mater.*, 2022, vol.5, pp.1852-1864.
9. Nagarajan S., Nagarajan R., Kumar J., Salemme A., Togni A. R., Saso L., Bruno F. [Antioxidant activity of synthetic polymers of phenolic compounds]. *Polymers*, 2020, vol.12, no.1646, pp.1-27.
10. Latos-Brozio M., Masek A., Piotrowska M. [Polymeric forms of plant flavonoids obtained by enzymatic reactions]. *Molecules*, 2022, vol.27, no.3702, pp.1-27.
11. Su J., Noro J., Silva S., Fu J., Wang Q., Ribeiro A., Silva C., Cavaco-Paulo A. [Antimicrobial coating of textiles by laccase *in situ* polymerization of catechol and *p*-phenylenediamine]. *Reactive and Functional Polymers*, 2019, vol.136, pp.25-33.
12. Slagman S., Zuilhof H., Franssen M. C. R. [Laccase-mediated grafting on biopolymers and synthetic polymers: a critical review]. *ChemBioChem*, 2018, vol.19, no.4, pp.288-311.
13. Gregory D. A., Tripathi L., Fricker A. T., Asare E., Orlando I., Raghavendran V., Roy I. [Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications]. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2021, vol.145, no.100623, pp.1-27.
14. Gilbert C., Tang T. C., Ott W., Dorr B. A., Shaw W. M., Sun G. L., Ellis T. [Living materials with programmable functionalities grown from engineered microbial co-cultures]. *Nature materials*, 2021, vol.20, no.5, pp.691-700.
15. Kolobova S. A., Nazmutdinov D. Z., Petuhova N. I. *Bakterial'naya tsellyuloza – perspektivnyy material dlya immobilizatsii mikroorganizmov-destruktorov fenola* [Bacterial cellulose is a promising material for the immobilization of phenol degrading microorganisms]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2019, vol.26, no.1, pp.105-111.

16. Estevinho B.N., Samaniego N., Talens-Perales D., Fabra M.J., Lopez-Rubio A., Polaina J., Marin-Navarro J. Development of enzymatically-active bacterial cellulose membranes through stable immobilization of an engineered β -galactosidase // *International journal of biological macromolecules*.– 2018.– V.115.– Pp.476-482.
17. Buruaga-Ramiro C., Valenzuela S.V., Valls C., Roncero M.B., Pastor F.J., Diaz P., Martinez J. Bacterial cellulose matrices to develop enzymatically active paper // *Cellulose*.– 2020.– V.27, №6.– Pp. 3413-3426.
18. Unlu F., Boran F., Yesilada O., Koytepe S. Laccase immobilization on bacterial cellulose produced in a mulberry pomace waste extract medium: characterization and use for dye decolorization // *Journal of Applied Polymer Science*.– 2023.– V.140, №24.– E53952.
19. Zhou W., Guan Z-B., Cai Y-J., Chen Y., Zhang N., Li X-R. Preparation and characterization of immobilized spores with laccase activity from *Bacillus pumilus* W3 on DEAE-cellulose and their application in decolorization // *Brazilian Journal of Chemical Engineering*.– 2017.– V.34, №1.– Pp.41-52.
20. Sheng S., Farinas E. T. Laccase and its mutant displayed on the *Bacillus subtilis* spore coat for oxidation of phenolic compounds in organic solvents // *Catalysts*.– 2021.– V.11, №606.– Pp.1-13.
21. Claus H., Filip Z. The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain // *Microbiological Research*.– 1997.– V.152, №2.– Pp.209-216.
22. Dencheva N., Oliveira S., Braz J., Getya D., Malfois M., Denchev Z., Gitsov I. Magnetically responsive PA6 microparticles with immobilized laccase show high catalytic efficiency in the enzymatic treatment of catechol // *Catalysts*.– 2021.– V.11, №239.– Pp.1-27.
23. Sys M., Metelka R., Frangu A., Vytras K., Arbneshi T. Electrochemical study of *Trametes versicolor* laccase compatibility to different polyphenolic substrates // *Chemosensors*.– 2017.– V.5, №9.– Pp.1-11.
24. Sun X., Bai R., Zhang Y., Wang Q., Fan X., Yuan J., Wang P. Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenolic compounds // *Applied biochemistry and biotechnology*.– 2013.– V.171.– Pp.1673-1680.
25. Guimaraes C., Kim S., Silva C., Cavaco-Paulo A. *In situ* laccase-assisted overdyng of denim using flavonoids // *Biotechnol. J.*– 2011.– V.6, №10.– Pp.1272-1279.
26. Kim S., Silva C., Evtuguin D. V., Gamelas J. A., Cavaco-Paulo A. Polyoxometalate/laccase-mediated oxidative polymerization of catechol for textile dyeing // *Applied microbiology and biotechnology*.– 2011.– V.89.– Pp.981-987.
27. Savitskaya I. S., Shokatayeva D. H., Kistaubayeva A. S., Ignatova L. V., Digel I. E. Antimicrobial and wound healing properties of a bacterial cellulose based material containing *B. subtilis* cells // *Heliyon*.– 2019.– V.5, №10 (E02592).– Pp.1-11.
28. Das P., Barbora L., Das M., Goswami P. Highly sensitive and stable laccase based amperometric biosensor developed on nano-composite matrix for detecting pyrocatechol in environmental samples // *Sensors and Actuators B*.– 2014.– V.192.– Pp.737-744.
29. Hestrin S., Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose // *Biochemical Journal*.– 1954.– V.58, №2.– Pp.345-352.
16. Estevinho B.N., Samaniego N., Talens-Perales D., Fabra M.J., Lopez-Rubio A., Polaina J., Marin-Navarro J. [Development of enzymatically-active bacterial cellulose membranes through stable immobilization of an engineered β -galactosidase]. *International journal of biological macromolecules*, 2018, vol.115, pp.476-482.
17. Buruaga-Ramiro C., Valenzuela S.V., Valls C., Roncero M.B., Pastor F.J., Diaz P., Martinez J. [Bacterial cellulose matrices to develop enzymatically active paper]. *Cellulose*, 2020, vol.27, no.6, pp.3413-3426.
18. Unlu F., Boran F., Yesilada O., Koytepe S. [Laccase immobilization on bacterial cellulose produced in a mulberry pomace waste extract medium: characterization and use for dye decolorization]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2023, vol.140, no.24, E53952.
19. Zhou W., Guan Z-B., Cai Y-J., Chen Y., Zhang N., Li X-R. [Preparation and characterization of immobilized spores with laccase activity from *Bacillus pumilus* W3 on DEAE-cellulose and their application in decolorization]. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2017, vol.34, no.1, pp.41-52.
20. Sheng S., Farinas E. T. [Laccase and its mutant displayed on the *Bacillus subtilis* spore coat for oxidation of phenolic compounds in organic solvents]. *Catalysts*, 2021, vol.11, no.606, pp.1-13.
21. Claus H., Filip Z. [The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain]. *Microbiological Research*, 1997, vol.152, no.2, pp.209-216.
22. Dencheva N., Oliveira S., Braz J., Getya D., Malfois M., Denchev Z., Gitsov I. [Magnetically responsive PA6 microparticles with immobilized laccase show high catalytic efficiency in the enzymatic treatment of catechol]. *Catalysts*, 2021, vol.11, no.239, pp.1-27.
23. Sys M., Metelka R., Frangu A., Vytras K., Arbneshi T. [Electrochemical study of *Trametes versicolor* laccase compatibility to different polyphenolic substrates]. *Chemosensors*, 2017, vol.5, no.9, pp.1-11.
24. Sun X., Bai R., Zhang Y., Wang Q., Fan X., Yuan J., Wang P. [Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenolic compounds]. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2013, vol.171, pp.1673-1680.
25. Guimaraes C., Kim S., Silva C., Cavaco-Paulo A. [In situ laccase-assisted overdyng of denim using flavonoids]. *Biotechnol. J.*, 2011, vol.6, no.10, pp.1272-1279.
26. Kim S., Silva C., Evtuguin D. V., Gamelas J. A., Cavaco-Paulo A. [Polyoxometalate/laccase-mediated oxidative polymerization of catechol for textile dyeing]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, vol.89, pp.981-987.
27. Savitskaya I. S., Shokatayeva D. H., Kistaubayeva A. S., Ignatova L. V., Digel I. E. [Antimicrobial and wound healing properties of a bacterial cellulose based material containing *B. subtilis* cells]. *Heliyon*, 2019, vol.5, no.10(E02592), pp.1-11.
28. Das P., Barbora L., Das M., Goswami P. [Highly sensitive and stable laccase based amperometric biosensor developed on nano-composite matrix for detecting pyrocatechol in environmental samples]. *Sensors and Actuators B*, 2014, vol.192, pp.737-744.
29. Hestrin S., Schramm M. [Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose]. *Biochemical Journal*, 1954, vol.58, no.2, pp.345-352.