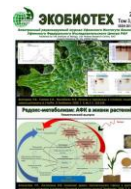




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ЛАККАЗЫ И ТИРОЗИНАЗЫ В ТАЛЛОМАХ ЛИШАЙНИКА *LOBARIA PULMONARIA* (L.) HOFFM.

Викторова Л.В., Галеева Е.И., Минибаева Ф.В.

Казанский институт биохимии и биофизики
ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия
E-mail: lar-viktorova@yandex.ru

Одним из ключевых факторов устойчивости лишайников к неблагоприятным условиям являются редокс-ферменты, которые участвуют в образовании меланина, защитного пигмента, синтезируемого микобионтом. В талломах лишайника *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. (Лобария легочная) с разной степенью меланизации выявлена активность лакказы, пероксидазы и тирозиназы. Определены изоэлектрические точки и молекулярные массы отдельных изоформ лакказы и тирозиназы. Изоферментный спектр этих ферментов в немеланизированных и меланизированных талломах лишайника *L. pulmonaria* не различался. Частичная очистка осажденных белков *L. pulmonaria* с помощью анионообменной хроматографии выявила пики активности лакказы и тирозиназы. Результаты 2D-электрофоретического разделения белков обнаружили две мажорные изоформы ферментов: 120 кДа с pI 6,6 и 60 кДа с pI 5,9, которые визуализировались при окрашивании гелей субстратами как лакказы, так и тирозиназы. Высказывается предположение, что в лишайнике *L. pulmonaria* L-DOPA не только является предшественником в реакции образования меланина с участием тирозиназы, но также может быть метаболизирован пероксидазами и лакказами. Обсуждается роль этих ферментов в синтезе меланина, а также генерации активных форм кислорода, участвующих в защите лишайников от патогенов и абиотических стрессоров.

Ключевые слова: *Lobaria pulmonaria*, изоформы, лакказа, меланин, редокс-ферменты, тирозиназа

LACCASES AND TYROSINASES IN THE THALLI OF LICHEN *LOBARIA PULMONARIA* (L.) HOFFM.

Viktorova L.V., Galeeva E.I., Minibayeva F.M.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics
FRC KazSC RAS, Kazan, Russia
E-mail: lar-viktorova@yandex.ru

Redox enzymes are one of the key factors of stress tolerance of lichens. They are involved in the formation of melanin, protective pigment synthesized by mycobiont. In the thalli of lichen *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. with different degree of melanization the activities of laccase, peroxidase and tyrosinase were detected. Isoelectric points and molecular masses of some isoforms of laccases and tyrosinases were assessed. In non-melanized and melanized thalli of *L. pulmonaria* the isoforms of these redox enzymes did not differ. Partial purification of precipitated proteins from *L. pulmonaria* using anion exchange chromatography demonstrated activity picks of laccase and tyrosinase. Following separation of proteins by 2D electrophoresis and staining with laccase and tyrosinase substrates, two major isoforms, one with molecular mass of 120 kDa and pI 6.6 and second with molecular mass of 60 kDa and pI 5.9 were found. It is suggested that in the lichen *L. pulmonaria* L-DOPA could not only be a precursor in the reaction of melanin synthesis mediated by tyrosinase but also could be metabolized by peroxidases and laccases. The role of these enzymes in the synthesis of melanin and generation of reactive oxygen species, which are involved in the defence of lichens from pathogens and abiotic stresses is discussed.

Keywords: *Lobaria pulmonaria*, isoforms, laccase, melanin, redox-enzymes, tyrosinase

Поступила в редакцию: 30.04.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-2-220-228](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-220-228)

ВВЕДЕНИЕ

Лишайники являются симбиотическими организмами, до 90–98% которых составляет микобионт, а минорный фитобионт представлен зелеными водорослями и/или цианобактериями. Лишайники произрастают во многих экологических нишах с

неблагоприятными климатическими условиями, от арктических пустынь до экватора. Такая способность к выживанию в экстремальных условиях существования обеспечивается особенностями их морфологического строения и метаболизма. Ключевым фактором устойчивости лишайников к неблагоприятным условиям среды, наряду с вторичными метаболитами, являются редокс-ферменты. Одним из стрессовых факторов для лишайников является избыточная инсоляция, а именно, ультрафиолетовое облучение в составе солнечного света. При освещении в верхнем слое таллома микобионта синтезируется темный пигмент меланин, количество которого увеличивается в ответ на увеличение количества солнечных лучей. Важная роль в синтезе меланина у лишайников принадлежит тирозиназе, которая, однако, не является единственным ферментом, участвующим в метаболизме *L*-дигидроксифенилаланина (*L*-DOPA), предшественника меланина. Лабораторные исследования показывают, что лишайниковые пероксидазы и лакказы быстро окисляют *L*-DOPA в темные пигменты и, следовательно, участвуют в меланизации [Liers et al., 2011]. Образование меланина повышает устойчивость организмов к абиотическим стрессорам, таким как ультрафиолетовое излучение, свободные радикалы, гамма-лучи, обезвоживание и экстремальные температуры [Solano, 2014]. Было сделано предположение, что меланины повышают устойчивость клеточных стенок к биотическим стрессорам, например, путем уменьшения активности гидролитических ферментов, выделяемых патогенами [Bell, Wheeler, 1986]. В лишайниках кортикальные меланины, как полагают, защищают фотобионт от чрезмерного света [Larsson et al., 2009].

Цель настоящего исследования – выделение, очистка и определение ряда характеристик ферментов лакказы и тирозиназы в меланизированной и немеланизированной формах лишайника *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил лишайник *L. pulmonaria*, собранный в окрестностях села Айша, республика Татарстан (рис. 1). Таллом очищали и высушивали при комнатной температуре, затем хранили в холодильной камере при температуре 4°C.



Рис. 1. Таллом *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm (фотография предоставлена Prof. Y. Gauslaa).

Грубый ферментный экстракт получали путем гомогенизации регидратированного (1 сутки) лишайника в жидком азоте и последующей экстракции в 50 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,0 в течение 1 ч. Гомогенат центрифугировали при 10000 g 30 мин. Экстракт высаливали сульфатом аммония, получая фракцию от 30 до 80% его насыщения, центрифугировали. Осадок ресуспензировали в минимальном объеме 25 мМ Трис-HCl буфера pH 7,5. После проведения диализа белки были частично очищены с помощью анионообменной хроматографии на колонке HiTrap Q FF (GE Healthcare, Sweden), уравновешенной тем же буфером (хроматографическая система ÄKTA™ start). Элюцию проводили NaCl в линейном градиенте концентрации (0–1 М) в стартовом буфере. Хроматографические фракции (1 мл), обладающие лакказной и тирозиназной активностью, объединяли и осаждали сульфатом аммония (60% насыщения). Осадок белка отделяли центрифугированием при 30000 g 30 мин, ресуспензировали, диализовали против MQ и использовали в экспериментах.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически на приборе UV-1600 (Shimadzu, Japan) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Активность лакказы определяли по скорости окисления 1 мМ *o*-дианизидина ($\epsilon_{460}=30,0 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) в 80 мМ ацетатном буфере, pH 4,5. Активность тирозиназы определяли по скорости окисления 2 мМ *L*-DOPA ($\epsilon_{475}=3,6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) в 50 мМ Na-фосфатном буфере pH 6,0.

Изоэлектрофокусирование проводили в 7%-ном ПААГ, используя амфолины pH 3,5–10,0 (Sigma-Aldrich, Sweden), согласно рекомендациям фирмы. Для калибровки геля использовали набор стандартных белков IEF mix 3,6–9,3 (Sigma-Aldrich, USA). «Полунативный» электрофорез проводили в 10% ПААГ по методу Laemmli в присутствии 0,1% ДДС-Na без добавления меркаптоэтанола и кипячения образцов на приборе MiniPROTEAN Tetra Cell (BioRad, USA). В качестве стандартов молекулярных масс использовали набор окрашенных маркеров Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, Lithuania).

Активность лакказы в геле выявляли путем его окрашивания 1 мМ *o*-дианизидином в 50 мМ ацетатном буфере pH 4,5. Активность пероксидазы оценивали при добавлении 2 мМ H₂O₂. Тирозиназу визуализировали путем инкубирования гелей в растворе, состоявшем из 10 мМ *L*-DOPA в 100 мМ Na-фосфатном буфере pH 6,0.

Эксперименты были проведены в 4-х повторностях в 3-х независимых экспериментах. Статистический анализ данных проводили с применением стандартных математических методов (расчет среднеквадратичного отклонения, сравнения средних по критерию Стьюдента) средствами программы Microsoft Excel-2019.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что лишайники продуцируют различные оксидоредуктазы, такие как медьсодержащие фенолоксидазы, тирозиназу и лакказу [Laufer et al., 2006a, b, 2009; Beckett et al., 2012] и гемсодержащие пероксидазы [Liers et al., 2011; Beckett et al., 2013a]. Считается, что наиболее значительную активность оксидоредуктаз, по сравнению с другими видами лишайников, проявляют лишайники Peltigerales [Beckett et al., 2014].

В качестве материала для исследования были взяты талломы лишайника *L. pulmonaria*, в которых образование меланина индуцировалось под влиянием естественного солнечного освещения. Талломы были рассортированы в зависимости от степени нарастания

меланизации: отсутствие коричневого пигмента (*L. pulmonaria* № 1), средняя степень меланизации (*L. pulmonaria* № 2) и выраженная степень меланизации (*L. pulmonaria* № 3). В экстракте лишайника обнаружена значительная активность лакказы и тирозиназы и небольшая активность пероксидазы (рис. 2).

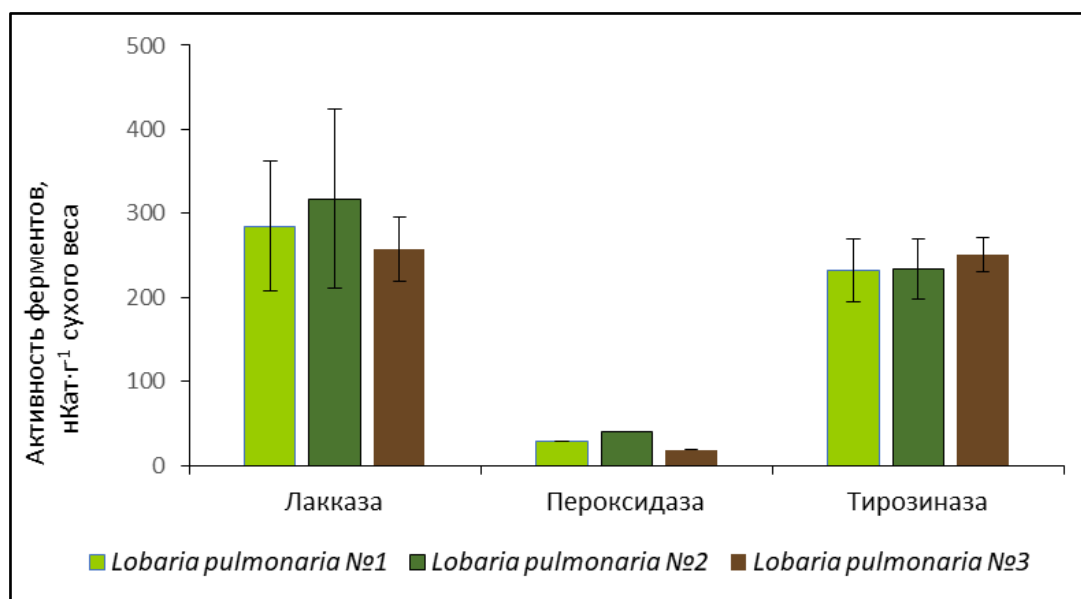


Рис. 2. Влияние степени меланизации лишайника *L. pulmonaria* на активность ферментов.

В зависимости от степени нарастания меланизации не наблюдалось выраженного изменения активности ферментов, только тирозиназа проявила тенденцию к небольшому увеличению активности. В работе Matee et al. [2016], исследовавших влияние различного по интенсивности и спектру света на образование меланина и активность ферментов, потенциально участвующих в образовании пигмента, сделано предположение об отсутствии простой корреляции между меланизацией и активностью тирозиназы лишайника *L. pulmonaria*. Несмотря на заманчивость гипотезы об участии лакказы в синтезе меланина, авторы считают, что увеличение активности этого фермента в условиях эксперимента, скорее могло быть реакцией на стресс. Было высказано предположение, что лакказы участвуют в различных стрессовых ответных реакциях грибов, в частности, при окислительных и нитрозильных стрессах.

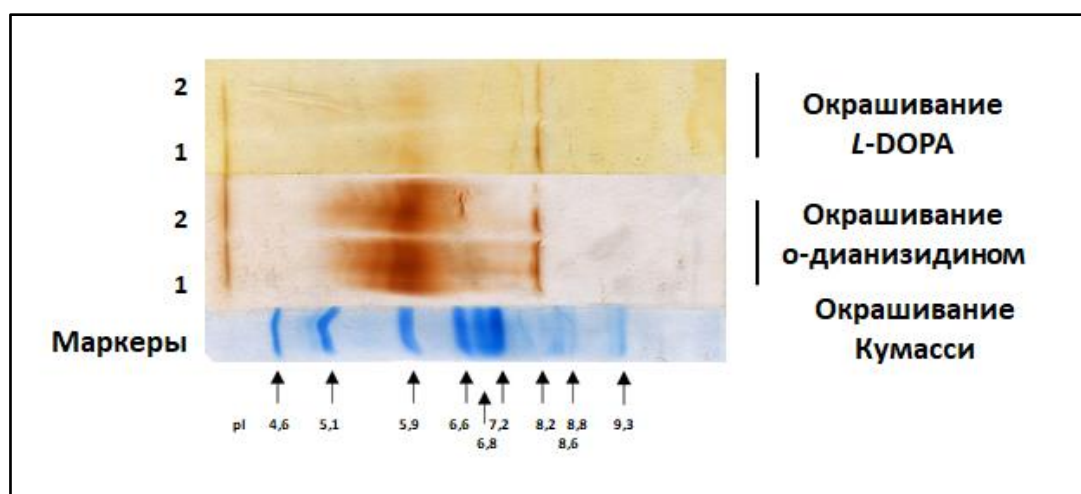


Рис. 3. Изоэлектрофоретические спектры белков экстракта *L. pulmonaria*; 1 – немеланизованная форма, 2 – меланизованная форма.

В результате изоэлектрофокусирования экстракта лишайника *L. pulmonaria* был получен спектр лакказ и тирозиназ (рис. 3). Изоформы были локализованы в кислой и нейтральной областях рI, характеризовались наличием двух мажорных изоформ с рI 5,9 и 6,6 и большого количества минорных изоформ. Компонентный состав изоферментов не различался между немеланизированной и меланизированной формами лишайника при окрашивании гелей субстратами лакказы и тирозиназы.

«Полунативный» электрофорез белков, осажденных из грубого экстракта лишайника *L. pulmonaria* сульфатом аммония (30–80%), и специфическое окрашивание *o*-дианизидином (рис. 4А), *o*-дианизидином в присутствии перекиси водорода (рис. 4В) и *L*-ДОРА (рис. 4С) выявили присутствие четырех изоформ ферментов с молекулярными массами 60, 100, 120, 190 кДа. Электрофоретический спектр всех трех ферментов у немеланизированной и меланизированной форм лишайника *L. pulmonaria* также был идентичен. В работе Matee et al. [2016] при проведении скрининга оксидоредуктаз *L. pulmonaria* нативный PAGE с *o*-дианизидином в качестве субстрата выявил одну изоформу лакказы с молекулярной массой 190 кДа, наличие фермента с аналогичной массой было также обнаружено в других лишайниках [Laufer et al., 2009; Liers et al., 2011]. Электрофоретическое разделение цитозольных белков и ферментов, связанных с клеточной стенкой из *Peltigera malacaea*, *Peltigera rufescens* и *Pseudocyphellaria aurata*, показало, что полоса с молекулярной массой 60 кДа появлялась в течение нескольких минут после инкубации в субстратах тирозиназы *L*-ДОРА или адреналине [Laufer et al., 2006a]. Эта масса была аналогична той, что характерна для других тирозиназ аскомицетов [Marusek et al., 2006]. Интересно, что инкубация гелей с *L*-ДОРА приводила к появлению полосы в том же месте, что и полоса лакказы, визуализированной путем окрашивания 2,6 диметоксифенолом (DMP). Добавление H₂O₂ в среду инкубации гелей с *L*-ДОРА с последующим окрашиванием в течение ночи свидетельствовало о том, что пероксидазы и лакказы также могут метаболизировать *L*-ДОРА [Matee et al., 2016]. Высокий окислительно-восстановительный потенциал лакказ в сочетании с низкой субстратной специфичностью объясняет способность лакказ окислять широкий спектр субстратов как природного, так и неприродного происхождения [Kunamneni et al., 2007].

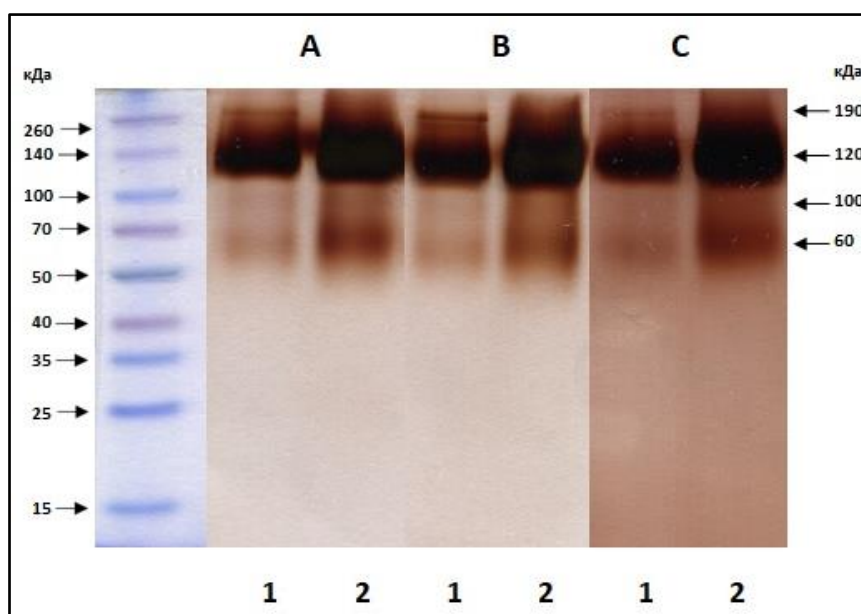


Рис. 4. Электрофорез (10% гель) белков, осажденных сульфатом аммония из экстракта лишайника *L. pulmonaria*; 1 – немеланизированная форма, 2 – меланизированная форма. Специфическое окрашивание *o*-дианизидином (А), *o*-дианизидином + H₂O₂ (В), *L*-ДОРА (С).

Laufer et al. [2009] исследовали разнообразие изоформ лакказы у 20 лишайников из подотряда Peltigerineae. Молекулярные массы большинства лакказ варьировали от 135 до 190 кДа, хотя у некоторых лишайников в семействе Peltigeraceae присутствовали лакказы с более высокими массами, обычно от 200 до 350 кДа. Как считают авторы, в отличие от лакказ свободно живущих грибов, которые обычно встречаются в виде мономеров, в лишайниках лакказы встречаются в виде разнообразных олигомеров с более высокой молекулярной массой. Для лишайника *P. malacea* [Laufer et al., 2006a] показано, что активной формой этого фермента является тетрамер с необычно высокой молекулярной массой 340 кДа. Lisov et al. [2007] обнаружили, что лишайники *Solorina crocea* и *Peltigera aphosa* содержали явно димерную лакказу с молекулярной массой около 170 кДа и более легкую мономерную форму с молекулярной массой около 85 кДа. В работе тех же авторов [Lisov et al., 2012] обнаружены димерная 155 кДа и мономерная формы лакказы 80 кДа. И мономер, и димер проявляли ферментативную активность, окисляя АВТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)) и ряд других субстратов, при этом они отличались по своим физико-химическим свойствам. В нашем эксперименте возможные мономерная (60 кДа) и димерная (120 кДа) формы фермента метаболизировали как *o*-дианизидин, так и *L*-ДОРА (рис. 3, 4).

Частичная очистка осажденных белков немеланизированной формы *L. pulmonaria* с помощью анионообменной хроматографии выявила пики активности лакказы и тирозиназы (рис. 5). Пик активности лакказы элюировался при концентрации 0,5–0,7 М NaCl. Ферменты, обладающие тирозиназной активностью, более прочно связывались с носителем и элюировались при более высоких концентрациях NaCl. При этом в некоторых элюированных фракциях наблюдалось совпадение субстратной специфичности. Фракции, которые характеризовались высокой активностью лакказы, не только легко метаболизировали субстрат лакказы *o*-дианизидин, но и катализировали окисление типичного субстрата тирозиназы *L*-ДОРА. Фракции с максимальной активностью тирозиназы, в свою очередь, также окисляли оба субстрата. В работе Laufer et al. [2009] при хроматографическом разделении ферментов клеточной стенки из *P. malacea* методом гель-фильтрации был выявлен пик активности лакказы с молекулярной массой около 380 кДа и пик активности тирозиназы с массой около 60 кДа. Фракции первого пика активно окисляли субстраты лакказы DMP, АВТС и гваякол и были менее активны в отношении субстратов тирозиназы *L*-ДОРА и адреналина. Фракции тирозиназного пика метаболизировали только тирозин, *L*-ДОРА и адреналин.

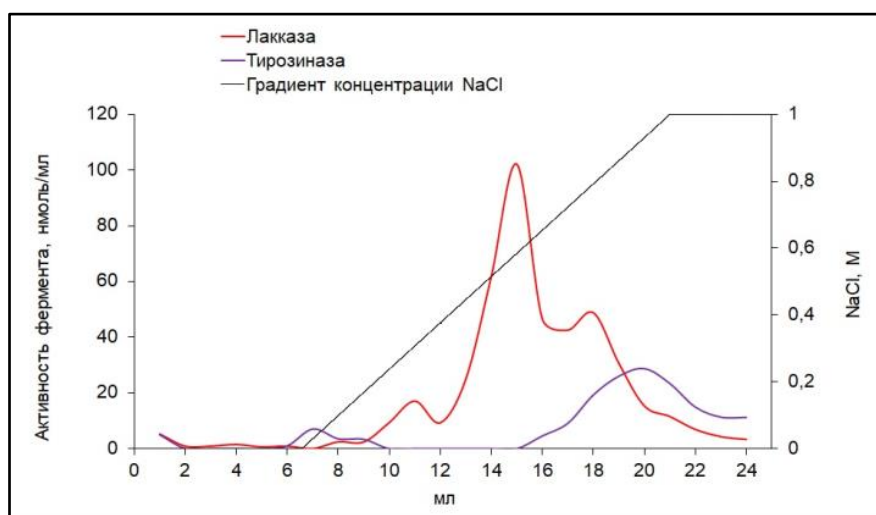


Рис. 5. Анионообменная хроматография белков, осажденных из экстракта лишайника *L. pulmonaria* (немеланизированная форма).

Очищенные белки из фракций с наибольшей активностью лакказы и тирозиназы были разделены с помощью изоэлектрического фокусирования в ряду рН 3,5–10,0 (рис. 6).

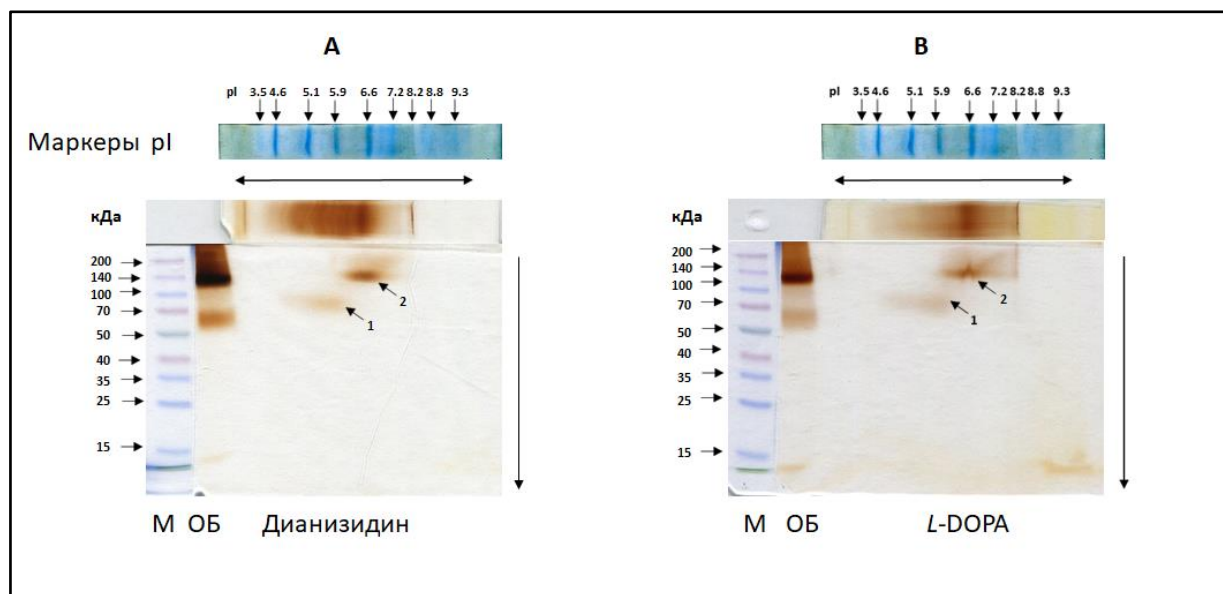


Рис. 6. 2D- электрофорез хроматографических пиков с активностью лакказы (А) и тирозиназы (В): 1 – 60 кДа (pI 5,9); 2 – 120 кДа (pI 6,6); ОБ – общий белок.

Специфическое окрашивание гелей с помощью субстратов лакказы и тирозиназы обнаружило наличие ряда анионных и нейтральных изоформ, среди которых преобладали два мажорных компонента с pI 5,9 и 6,6. Компонентный состав белков лакказного и тирозиназного пиков был идентичен. Дальнейшее электрофоретическое разделение белков во втором направлении по молекулярной массе показало, что изоформа с pI 6,6 имела молекулярную массу 120 кДа, а изофермент с pI 5,9, соответственно, 60 кДа (рис. 6).

Результаты ИЭФ, 1D- и 2D-электрофореза позволяют предположить, что в лишайнике *L. pulmonaria* присутствует редокс-фермент, проявляющий специфичность по отношению к субстратам как лакказы, так и тирозиназы. Мы предполагаем, что этим ферментом является лакказа. В литературе имеется достаточно информации о том, что в лишайниках лакказа способна метаболизировать *L-DOPA* [Laufer et al., 2009; Liers et al., 2011; Beckett et al., 2013a и др.], и, напротив, нет сведений о том, что тирозиназа может окислять *o*-дианизидин. Таким образом, в лишайнике *L. pulmonaria* *L-DOPA* не только участвует в качестве предшественника в реакции образования меланина с участием тирозиназы, но также может быть метаболизирована пероксидазами и лакказами.

Основная роль оксидоредуктаз в свободноживущих грибах заключается, по-видимому, в расщеплении древесины, а также участии в процессах гумификации [Морозова и др., 2007]. В лишайниках, помимо этого, ферменты могут играть дополнительную роль, например, участвуя в биосинтезе меланина [Beckett et al., 2013b]. Однако, несмотря на то, что эти ферменты обладают широкой субстратной специфичностью, часто предполагается, что их основная роль заключается в генерации активных форм кислорода (АФК) [Beckett et al., 2013b]. Образование АФК может происходить напрямую, если доступен подходящий восстановитель, такой как NADH, либо с помощью косвенного механизма, включающего внеклеточный окислительно-восстановительный цикл, который был подробно описан у свободноживущих грибов [Gómez-Toribio et al., 2009]. АФК могут участвовать в защите от патогенов и абиотических стрессов, а также защищать грибы посредством полимеризации

реакционноспособных фенолов и хинонов, образующихся в качестве побочных продуктов во время расщепления лигноцеллюлозы [Sinsabaugh, 2010].

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа осуществлялась в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН, а также поддержана грантом РФФИ № 18-14-00198 (очистка белков).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Морозова О.В., Шумакович Г.П., Шлеев С.В. и др. Лакказа-медиаторные системы и их использование // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43 (5). С. 583–597.
2. Beckett R.P., Minibayeva F.V., Liers C. Occurrence of high tyrosinase activity in the non-Peltigeralean lichen *Dermatocarpon miniatum* (L.) W. Mann // Lichenologist. 2012. V. 44 (6). P. 827–832. <https://doi.org/10.1017/S0024282912000394>
3. Beckett R.P., Minibayeva F.V., Liers C. On the occurrence of peroxidase and laccase activity in lichens // Lichenologist. 2013a. V. 45 (2). P. 277–283. <https://doi.org/10.1017/S0024282912000771>
4. Beckett R., Zavarzina A.G., Liers C. Oxidoreductases and cellulases in lichens: possible roles in lichen biology and soil organic matter turnover // Fungal Biology. 2013b. V. 117. P. 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.04.007>
5. Beckett R.P., Minibayeva F.V., Vinogradova A., Liers C. Hydration in the dark can induce laccase and peroxidase activity in Peltigeralean and non-Peltigeralean lichens // Lichenologist. 2014. V. 46 (4). P. 589–593. <https://doi.org/10.1017/S0024282914000152>
6. Bell A.A., Wheeler M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins // Annual Review of Phytopathology. 1986. V. 24. P. 411–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.002211>
7. Gómez-Toribio V., García-Martín A. B., Martínez M. J., et al. Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling // Applied and Environmental Microbiology. 2009. V. 75. P. 3944–3953. <https://doi.org/10.112/AEM.02137-08>
8. Halaouli S., Asther M., Sigoillot J.-C. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications // Journal of Applied Microbiology. 2006. V. 100. P. 219–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02866.x>
9. Kunamneni A., Ballesteros A., Plou F.J., et al. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications // In: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Ed. by Mendez-Vilas A. 2007. V. 1. P. 233–245.
10. Larsson P., Vecerova K., Cempirkova H., et al. Does UV-B influence biomass growth in lichens deficient in sun-screening pigments? // Environmental and Experimental Botany. 2009. V. 67. P. 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.021>
11. Laufer Z., Beckett R.P., Minibayeva F.V. Co-occurrence of the multicopper oxidases tyrosinase and laccase in lichens in sub-order *Peltigerineae* // Annals of Botany. 2006a. V. 98. P. 1035–1042. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl184>
12. Laufer Z., Beckett R.P., Minibayeva F.V., et al. Occurrence of laccases in lichenized ascomycetes of the *Peltigerineae* // Mycological Research. 2006b. V. 110. P. 846–853. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.03.011>

13. Laufer Z., Beckett R.P., Minibayeva F.V. et al. Diversity of laccases from lichens in suborder Peltigerineae // *Bryologist*. 2009. V. 112. P. 418–426.
14. Liers C., Ullrich R., Hofrichter M., et al. Oxidoreductases from lichenized ascomycetes: purification and characterization of a heme-peroxidase from *Leptogium saturninum* that oxidizes high-redox potential substrates // *Fungal Genetics and Biology*. 2011. V. 48. P. 1139–1145. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.10.004>
15. Lisov A.V., Zavarzina A.G., Zavarzin A.A., et al. Laccases produced by lichens of the order Peltigerales // *FEMS Microbiology Letters*. 2007. V. 275. P. 46–52. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00858.x>
16. Lisov A., Zavarzina A., Zavarzin A., et al. Dimeric and monomeric laccases of soil-stabilizing lichen *Solorina crocea*: Purification, properties and reactions with humic acids // *Soil Biology and Biochemistry*. 2012. V. 45. P. 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.11.004>
17. Marusek C.M., Trobaugh N.M., Flurkey W.H., et al. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2006. V. 100. P. 108–123. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.10.008>
18. Matee L.P., Beckett R.P., Solhaug K.A., Minibayeva F.V. Characterization and role of tyrosinases in the lichen *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. // *Lichenologist*. 2016. V. 48 (4). P. 311–322. <https://doi.org/10.1017/S0024282916000293>
19. Solano F. Melanins: skin pigments and much more – types, structural models, biological functions, and formation routes // *New Journal of Science*. 2014. P. 1–28. <https://doi.org/10.1155/2014/498276>
20. Sinsabaugh R.L. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil // *Soil Biology and Biochemistry*. 2010. V. 42. P. 391–404. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.014>