

## БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛАККАЗ

О.Н. Понаморева<sup>1</sup>, Л.И. Трубицина<sup>2</sup>, С.В. Алферов<sup>1</sup>, А.В. Абдуллатыпов<sup>1,3</sup>, В.А. Алферов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Тульский государственный университет», Тула, 300012, Россия

<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцино, Московская обл., 142290, Россия

<sup>3</sup> Институт фундаментальных проблем биологии РАН Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцино, Московская обл., 142290, Россия

### Введение

Инновационным подходом в области технологии получения биотоплива, производства биоразлагаемых материалов, технологий биоремедиации является биоэлектрокатализ. Биоэлектрокатализ – процесс, в котором успешно использует ферменты для катализа окислительно-восстановительных реакций, протекающих на электродах. Как междисциплинарная область исследований, возникшая в результате взаимодействия электрокатализа и биокатализа, биоэлектрокатализ объединяет преимущества каждого направления и представляет собой хорошо обоснованную концепцию зеленой химии. Учитывая экологические ограничения в применении традиционных эффективных химических катализаторов, исследовательские сообщества в настоящее время больше заинтересованы в биокатализаторах, которые могли бы заменить эффективные металлические катализаторы в электрокаталитических процессах. Применение ферментов в электрохимических реакциях безусловно перспективно, но существуют некоторые ограничения в этом направлении. Тем не менее, с развитием функциональной геномики появилась возможность адаптировать ферменты для целевого использования, в том числе в биоэлектрокатализе [1].

**Лакказы как биокатализаторы в электрокатализе.** Ведущее место среди важнейших биоэлектрокатализаторов занимают медьсодержащие оксидазы. Медные центры служат платформой для переноса электронов к атому кислорода; благодаря обратимым изменениям степени окисления атомов меди  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$ , что имеет важное значение с точки зрения электрокатализа. Атомы меди координированы несколькими аминокислотами, изменение которых в полипептидной цепи может привести к повышению окислительно-восстановительного потенциала системы от 85 мВ до >1000 мВ [2], что значительно выше теоретического окислительно-восстановительного потенциала системы  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$  (приблизительно 150 мВ) относительно нормального водородного электрода сравнения в воде.

Важнейшим и многочисленным представителем медьсодержащих оксидаз являются лакказы. Ферменты лакказы (КФ 1.10.3.2, пара-дифенол: кислород оксидоредуктаза) относятся к классу голубых медьсодержащих оксидаз, широко распространены в природе и участвуют в процессах окисления широкого диапазона субстратов под действием молекулярного кислорода с образованием воды. Лакказы встречаются во многих микроорганизмах, грибах, растениях [3].

Структурно все лакказы содержат четыре атома меди и образуют с лигандами три типа металлоцентров (T1, T2, T3). T1-центр в молекуле фермента отвечает за взаимодействие с субстратами и за отрыв от них электронов. Установлено, что именно этот медный центр обеспечивает внеклеточный перенос электронов от электрода на фермент в биоэлектрокатализе [4]. Лакказы разных организмов отличаются по свойствам, в том числе по способности окислять различные соединения, что обусловлено величиной редокс-потенциала ( $E^0$ ) T1-медного центра. Редокс-потенциал, в свою очередь, связан с координационной геометрией и лигандами в этом центре. Поскольку цистеин и два гистидиновых остатка в основном консервативны у медьсодержащих оксидаз, то только аксиальный остаток метионина вмешивается во внутримолекулярный перенос электронов, тем самым влияя на поступление электрона от субстрата к ферменту (рис. 1) [5]. Таким образом, анализ имеющейся информации по влиянию аминокислот на редокс-потенциал медьсодержащих белков [1] позволяет заключить, что присутствие аксиального метионина (как у растительных и бактериальных лакказ) приводит к снижению потенциала в диапазоне 340–470 мВ, и лакказы, проявляющие такой низкий  $E^0$  T1-центра, относят к низкопотенциальным лакказам.

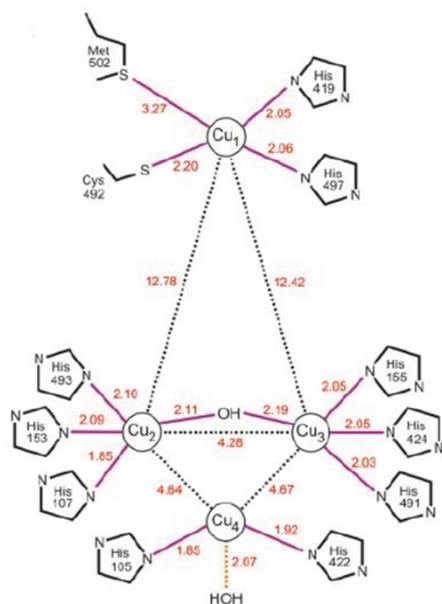


Рисунок 2. Медные центры белка CotA с лакказной активностью из штамма *Bacillus subtilis*.

Схематическое представление трёх медных центров меди, включая межатомные расстояния между всеми соответствующими атомами (согласно [5]).

двухдоменные лакказы активны в мультимерных формах (гомотримеры, гомогексамеры) [7, 8]. Все охарактеризованные к настоящему времени двухдоменные лакказы (меньше двух десятков) обнаружены у бактерий, принадлежащих к филуму *Actinobacteria*, большинство из них выделено из бактерий рода *Streptomyces*. Делеция одного домена и придает бактериальным лакказам необычные свойства. Результаты исследований по лакказам из актинобактерий *Streptomyces* недавно суммированы в обзоре [9]. Учитывая необычные физико-химические свойства, а также небольшое количество охарактеризованных представителей этой группы, поиск, получение и исследование новых двухдоменных белков с заданными свойствами является перспективной задачей. Получение, характеристика и изучение возможностей этих лакказ в биоэлектродкатализе является одним из направлений исследований нашего коллектива.

**Направленная эволюция лакказ.** Наиболее известным и благоприятным рациональным подходом, традиционно используемым для изменения аминокислотных остатков в ферментах, является сайт-направленный мутагенез [10]. Для реализации поставленной цели проводили поиск генов двухдоменных лакказ среди актинобактерий, их клонирование и дальнейшую экспрессию в гетерологичной системе экспрессии (чаще всего в штамме *Escherichia coli*). Ранее в геноме актинобактерии *Streptomyces carpinensis* был обнаружен ген не исследованной двухдоменной лакказы (номер аминокислотной последовательности в NCBI – WP 086728190.1), при экспрессии которого нарабатывался белок, обладающей повышенной окислительной активностью. В геноме актинобактерии *Catenuloplanes japonicus* ВКМ Ас-875 была идентифицирована лакказа (WP\_033344226.1), классифицированная как двухдоменная, обладающая высокой степенью гомологии с лакказой из штамма *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ас-1300 (62%), имеющая высокую степень гомологии в консервативном микроокружении активных центров лакказы, а также, согласно разработанным гипотезам, естественную аминокислотную замену, влияющую на степень окислительной активности фермента (замена аланина в мотиве GAGA, широко представленного у низкопотенциальных двухдоменных лакказ, на аминокислоту треонин GAGT).

В геноме *Streptomyces ochraceiscleroticus* ВКМ Ас-651 была обнаружена двухдоменная лакказ (WP\_031060324.1), также обладающая высокой степенью гомологии с лакказой из *S. carpinensis* ВКМ Ас-1300 (67%), в том числе в консервативном микроокружении активных центров лакказы, и имеющая аминокислотную замену, предположительно влияющую на степень окислительной активности фермента (мотив GAGS). Для проведения сравнительного анализа мы взяли ранее исследованную и охарактеризованную низкопотенциальную лакказу из штамма *Streptomyces viridochromogenes* ВКМ Ас-629 (AFR45923.1), обладающую высокой термостабильностью, при этом сниженной окислительной активностью, и провели сайт-направленный мутагенез высокоактивной лакказы из актинобактерии *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ас-1300 (для получения лакказы 1300Т). Выравнивание последовательностей двухдоменных лакказ, исследуемых в рамках данной работы проводилось в программе Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Таким образом, объектами исследований в биоэлектродкатализе стали лакказы 1300 и 651, биохимические свойства которых изучали ранее (данные не опубликованы), а также полученная лакказа 875 [11], и новая лакказа 1300Т.

**Механизмы переноса электронов в биоэлектродкаталитических системах на основе лакказ**

Независимо от способа иммобилизации лакказы на поверхности электрода, перенос электронов происходит двумя различными способами: медиаторный (опосредованный) перенос электронов (МПЭ) [1] и прямой перенос электронов (ППЭ) (рис. 2).

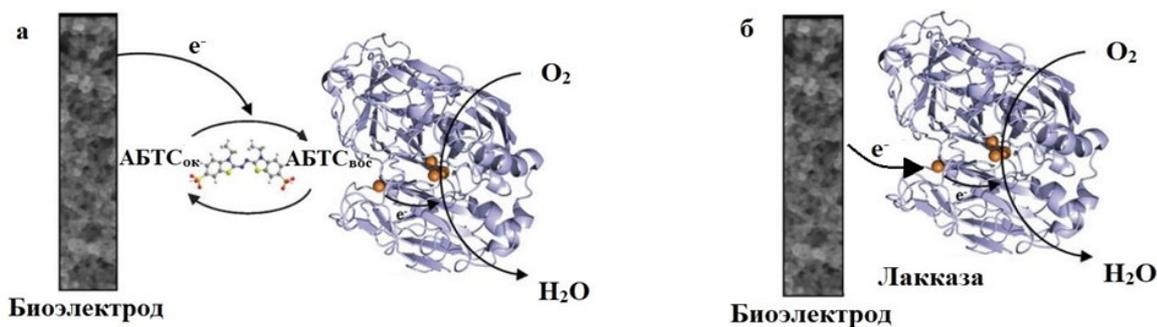


Рисунок 2. Схема медиаторного и прямого переноса электрона в лакказах (на основании рисунка в работе [1])

В режиме МПЭ электроны перемещаются с поверхности электрода на активный центр фермента через окислительно-восстановительный посредник (медиатор). В качестве медиатора чаще всего используют 2,2-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (АБТС), но могут применяться и другие субстраты лакказ, которые после окисления лакказами способны окислять другие соединения, не являющиеся субстратами данного фермента. В режиме ППЭ окислительно-восстановительные посредники не требуются, вместо этого необходима ориентированная иммобилизация на электродах.

В наших исследованиях сравнивали прямой и медиаторный перенос электронов в биоэлектродкаталитических системах на основе описанных выше бактериальных лакказ. Для этого использовали графитовые грифели Bruno Visconti Graphix (твёрдость НВ, диаметр 2,0 мм), поверхность которых модифицировали многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ) («Таунит») по методике [12]. Электрохимические измерения проводили при помощи гальванопотенциостата «РС-micro» (Вольта, Россия) в электролитической ячейке, заполненной 4 мл Na-ацетатного буферного раствора (рН = 5,0) при постоянном потенциале 170 мВ относительно хлорсеребряного электрода сравнения в среде, насыщенной аргоном и в присутствии воздуха; при добавлении медиатора (50 мкл 1 мМ АБТС) и в его отсутствии. Долю правильно ориентированных лакказ определяли как отношение силы тока ППЭ ( $I_{ППЭ}$ , мкА) к суммарной силе тока ППЭ и МПЭ ( $I_{ППЭ} + I_{МПЭ}$ , мкА). Все исследуемые лакказы способны участвовать в прямом переносе электронов в такой системе, но доля правильно ориентированных ферментов отличалась при приготовлении лакказных электродов по одной методике (рис. 3).

Важно отметить, что лакказыные электроды не теряли свой биоэлектрокаталитической активности через 5 дней. Несмотря на некоторое различие в электрохимическом поведении биоэлектродов на основе одной и той же лакказы, тем не менее можно заключить, что более эффективный ППЭ наблюдается у фермента 875 по сравнению с другими исследуемыми лакказами (доля правильно ориентированных молекул белка около 60 % по сравнению с 8–10 % у других лакказ) [12].

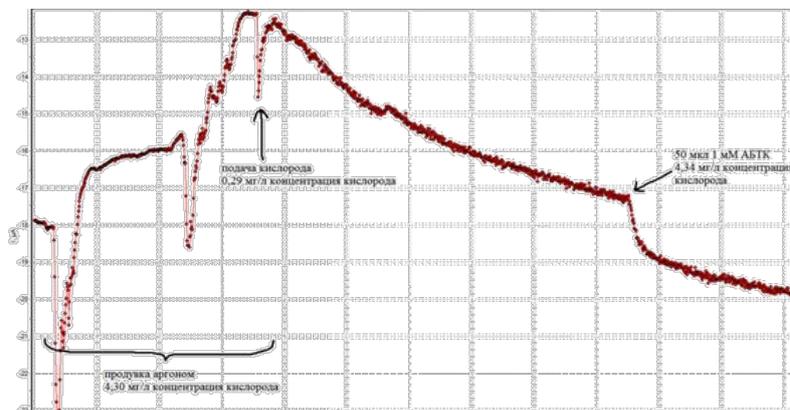


Рисунок 3. Амперометрическая характеристика биоэлектродов на основе графитового грифеля, МУНТ и лакказы 875 при потенциале + 170 мВ относительно хлорсеребряного электрода.

**Методы определения редокс-потенциала лакказ.** Редокс-потенциал Т1-медного центра лакказ обычно определяют методом редокс-титрования в присутствии специфических для каждой области потенциалов редокс-соединений в анаэробной среде [13], что затрудняет быстрый скрининг различных лакказ по этому параметру. Опосредованно о величине редокс-потенциала можно судить по спектру окисляемых ферментами субстратов, что тоже является трудоемким исследованием. Для сравнительной оценки редокс-потенциалов лакказ предложено использовать амперометрический метод анализа, основанный на регистрации тока восстановления лакказных электродов в среде без кислорода и в присутствии кислорода при заданном потенциале на электроде. Ток ППЭ начинает наблюдаться при потенциале, близком к потенциалу Т1-центра лакказ, но только для правильно ориентированных молекул фермента [14]. Несмотря на то, что установить определенный потенциал таким методом не удастся, сравнительный анализ серии биоэлектродов позволил заключить, что потенциал Т1-центра увеличивается в ряду лакказ: 875 < 1300 < 1300Т < 651. За установление редокс-потенциала лакказ отвечают многочисленные факторы, такие как: гидрофобность участка Т1-центра; электронное взаимодействие металл-лиганд; водородная связь с координированным атомом серы цистеина; замены в основной белковой цепи [1]. Полученные результаты вносят дополнительный вклад в понимание механизмов формирования редокс-активности лакказ.

**Иммобилизация лакказ на углеродных материалах.** Большинство электродных материалов, используемых в биоэлектрохимии, являются углеродными материалами, которые обладают превосходными физическими и химическими свойствами, такими как электропроводность, теплопроводность, химическая стабильность, низкая плотность, и широко доступны. В биоэлектрохимических исследованиях в нашем коллективе обычно использовали стеклоуглеродные электроды (спектральный графит), графитово-пастовые электроды и электроды, полученные трафаретной печатью (печатные электроды). В последнее время графитовые стержни (грифели, ГС) используются как рабочие электроды в качестве альтернативы обычным углеродным [15]. Все эти материалы мы использовали в своих исследованиях биоэлектрокаталитических свойств лакказ. Наилучшие результаты получили при использовании графитово-пастовых электродов. Для увеличения силы тока и сопряжения электродов с биоматериалом и электроактивными соединениями поверхность углеродных электродов химически модифицируют: окислением сильными кислотами; углеродными нанотрубками; различными полициклическими соединениями, среди которых коронен, структура которого одновременно напоминает структуру графена и ароматических субстратов лакказы.

Все исследуемые электроды способны адсорбировать лакказы, что определяли по их способности к медиаторному биоэлектрокатализу в присутствии АБТС. Однако только биоэлектроды, модифицированные МУНТ, генерировали небольшие токи восстановления кислорода в отсутствие медиатора. Адсорбированный на поверхности МУНТ коронен приводил к снижению токов восстановления лакказных электродов, что, вероятно, обусловлено плоским расположением молекул коронена на поверхности МУНТ. Такая локализация коронена не способствует направленной ориентации Т1-центра лакказ к поверхности нанотрубок. Для увеличения степени ориентированных молекул фермента необходимо разрабатывать методы модификации МУНТ аналогами субстрата в перпендикулярной ориентации к поверхности нанотрубок.

### **Заключение**

Несмотря на низкий окислительно-восстановительный потенциал и низкий уровень производства, двухдоменные бактериальные лакказы обладают рядом характерных особенностей, таких как относительно небольшой размер, способность работать в широком диапазоне рН, широкая субстратная специфичность и устойчивость к ингибиторам, таким как азиды и фториды. Применение такого инструмента генной инженерии, как сайт-направленный мутагенез, может помочь в создании лакказ с высоким окислительно-восстановительным потенциалом и при этом обладающих преимуществами бактериальных лакказ, что важно для разработки биоэлектрокаталитических систем (биосенсоров и биотопливных элементов).

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Госзадание № FEWG-2020–0008).*

### **Литература**

1. Dey B. and Dutta T. Laccases: Thriving the domain of bio-electrocatalysis. // *Bioelectrochemistry*, 2022. V. 146. P. 108144.
2. Mano N. and de Poulpique A. O<sub>2</sub> Reduction in enzymatic biofuel cells. // *Chemical Reviews*, 2018. V. 118(5). P. 2392–2468.
3. Морозова О.В., Шумакович Г.П., Горбачева М.А., Шлеев С.В., Ярополов А.И. «Голубые» лакказы. // *Биохимия*, 2007. Т.72(10). С. 1396–1412.
4. Shleev S., Tkac J., Christenson A., Ruzgas T., Yaropolov A.I., Whittaker J.W., Gorton L. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. // *Biosensors and Bioelectronics*, 2005. V.20(12). P. 2517–2554.
5. Enguita F.J., Martins L.O., Henriques A.O., Carrondo M.A. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. // *J Biol Chem*, 2003. V.278(21). P. 19416–25.
6. Chauhan P.S., Goradia B., Saxena A. Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. // *3 Biotech*, 2017. V.7.
7. Trubitsina L.I., Tishchenko S.V., Gabdulkhakov A.G., Lisov A.V., Zakharova M.V., Leontievsky A.A. Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*. // *Biochimie*, 2015. V.112. P. 151–159.
8. Lisov A.V., Trubitsina L.I., Lisova Z.A., Trubitsin I.V., Zavarzina A.G., Leontievsky A.A. Transformation of humic acids by two-domain laccase from *Streptomyces anulatus*. // *Process Biochemistry*, 2019. V.76. P. 128–135.
9. Kaur R., Salwan R., Sharma V. Structural properties, genomic distribution of laccases from *Streptomyces* and their potential applications. // *Process Biochemistry*, 2022. V.11. P. 133–144.
10. Luo, Q., Chen Y., Xia J., Wang K. – Q., Cai Y. – J., Liao X. – R., Guan, Z. – B. Functional expression enhancement of *Bacillus pumilus* CotA-laccase mutant WLF through site-directed mutagenesis. // *Enzyme and Microbial Technology*, 2018. V.109. P. 11–19.
11. Trubitsina, L.I., Abdullatypov A.V., Larionova A.P., Trubitsin I.V., Alferov S.V., Ponamoreva O.N., Leontievsky A.A., Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes. // *PeerJ* 2021. V.9. e11646.
12. Алферов, С.В., Абдуллатыпов А.В., Трубицина Л.И., Якимович С.В., Бабкина Е.Е., Петракова М.П., Понаморева О.Н. Биоэлектрокаталитические бактериальных двухдоменных лакказ. // *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки*, 2022. № 1ю С. 9–20.
13. Christenson A., Shleev S., Mano N., Heller A., Gorton L. Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 2006. V.1757(12). P. 1634–1641.
14. Che A. – F., Germain V., Cretin M., Cornu D., Innocent C., Tingry S. Fabrication of free-standing electrospun carbon nanofibers as efficient electrode materials for bioelectrocatalysis. // *New Journal of Chemistry*, 2011. V.35(12). P. 2848–2853.
15. Torrinha, Á.; Jiyane, N.; Sabela, M.; Bissety, K.; Montenegro, M.C.B.S.M.; Araújo, A.N., *Nanostructured pencil graphite electrodes for application as high power biocathodes in miniaturized biofuel cells and bio-batteries*. // *Scientific Reports* 2020. V. 10(1). P.16535.