

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАККАЗ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОКАТОДОВ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ.

С.В. Алферов, В.И. Голикова, Т.А. Гордеева

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Постоянно увеличивающиеся истощение запасов ископаемого топлива и необходимость в «чистых» методах производства электроэнергии поспособствовали появлению новых источников устойчивой и возобновляемой электроэнергии без выбросов парниковых газов или загрязнения окружающей среды. Среди этих альтернативных источников производство электроэнергии с использованием биотопливных элементов (БТЭ) представляет собой перспективное направление современной энергетики.

Биотопливный элемент является подклассом топливных элементов, где используются окислительно-восстановительные реакции в биологических объектах для специфического окисления субстратов (спиртов, водорода, лактата, сахаров, таких как глюкозы, фруктозы, лактозы или целлобиозы) на аноде и восстановления окислителей (O_2 , H_2O_2) на катоде с целью получения электроэнергии [1]. Подавляющее большинство этих биотопливных элементов вырабатывают электроэнергию за счет ферментного расщепления глюкозы и восстановления кислорода. Однако реакция восстановления кислорода на графитовом электроде имеет высокое значение перенапряжения, в связи с чем, протекает достаточно неэффективно. Это обстоятельство формирует необходимость использования кислород-восстанавливающего биокатода. Подавляющее большинство таких электродов базируется на ферментах лакказах или билирубиноксидазах (БОД).

Лакказа – фермент, относящийся к классу голубых медьсодержащих оксидаз, преимущественно распространённых среди растений и грибов. Впервые этот фермент был обнаружен в японском лаковом дереве *Rhus vernicifera* [2]. С тех пор эти ферменты идентифицировали в различных видах растений, насекомых и бактерий [3, 4]. Большинство детально изученных в настоящее время лакказ выделены из различных грибов [5, 6]. Основными функциями грибных лакказ считаются участие в процессах образования и деградации лигнина, в морфогенезе гриба, во взаимодействии паразит / хозяин, а также в защите от стресса. Большинство грибов продуцируют несколько изоформ и изоферментов лакказ. Хотя большинство грибных лакказ являются мономерными белками, в литературе описаны ферменты, состоящие из нескольких субъединиц. Молекулярный вес мономера варьируется от 50 до 130 кДа. Лакказы являются гликопротеинами. Содержание углеводной части, состоящей, как правило, из маннозы, N-ацетилглюкозамина и галактозы, составляет от 10 до 45 % от массы белка. Считается, что углеводная часть отвечает за стабильность фермента [7, 8].

Активный центр лакказы содержит четыре иона меди. Один из медных центров относится к первому типу (Т1), а остальные образуют трехядерный Т2/Т3 кластер, содержащий один ион меди второго типа (Т2) и два иона меди третьего типа (Т3) [9, 10]. Ион меди Т1 отвечает за интенсивную голубую окраску фермента и имеет ярко-выраженное электронное поглощение, приблизительно 600 нм (ЭПР). Ион меди Т2 бесцветен, но обнаруживается с помощью ЭПР; ион меди Т3 состоит из пары атомов меди, которые характеризуются слабым поглощением вблизи УФ-спектра и отсутствием сигнала ЭПР [11]. Т1 центр лакказ является первичным акцептором электронов от субстратов-доноров. Для некоторых лакказ определён редокс-потенциал Т1 центра, который для большинства грибных лакказ составляет ~750–780 мВ (отн. НВЭ), а для растительных лакказ 420–440 мВ (отн. НВЭ) [12]. Значение редокс-потенциалов Т1 центра лакказ имеет большое значение при каталитическом окислении различных субстратов.

Лакказы, в зависимости от продуцирующего их организма – бактерий, грибов или растений, характеризуются удивительно широкой субстратной специфичностью и богатым диапазоном окисляемых субстратов [13]. Так, в качестве неорганических субстратов могут выступать, например, цианокомплексы Fe, Mo, Ir, W (с формулой $[Me(CN)^x]^{y-}$), соединения Mn^{2+} [13]. В тоже время эти ферменты могут катализировать окисление различных органических соединений, среди которых орто- и пара-фенолы, полифенолы, аминифенолы, полиамины, лигнины, арилдиамины и другие.

Важно заметить, что неорганические субстраты выступают в качестве доноров электронов, в то время как органические – доноров атомов водорода, которые при ферментативном катализе отщепляются от органической молекулы с образованием радикала.

В последнее время повышенное внимание уделяется биоэлектрохимическим аспектам применения лакказ, в частности для создания биосенсоров для детекции фенолов и полифенольных соединений в сточных водах пищевой промышленности и для разработки биокатодов топливных элементов.

Основным преимуществом использования лакказ для разработки биоанодов является возможность низкопотенциального восстановления кислорода в воде при нейтральном значении pH. В нормальных условиях при использовании металлических и углеродных электродов при pH=5 термодинамический редокс потенциал пары O_2/H_2O находится в области +0,93 В (отн. НВЭ). Имобилизованные на электроде медьсодержащие оксидазы, такие как лакказы и билирубиноксидазы, демонстрируют возможность восстановления кислорода при среднем значении pH [14]. При эффективной иммобилизации лакказы на поверхности электродов из таких организмов, как *Trametes versicolor* или *Trametes hirsuta*, электрокаталитическое восстановление O_2 достигается при значении pH=4–7 при низком перенапряжении в 30–70 мВ [15–17]. Связывание и разрывание связей кислород-кислород происходит в медном кластере T2/T3. Для доставки электронов в этот каталитический центр возможны 2 механизма – медиаторный и прямой перенос электронов.

Прямой перенос электрона (ППЭ) реализуется в случае если активные медные центры фермента находятся достаточно близко к поверхности электрода. Поскольку электрон может быть транспортирован лишь на расстояние около 2,5 нм [18], ППЭ между поверхностью электрода и лакказой возможен только в том случае, если фермент удачно ориентирован относительно поверхности электрода. Фермент считают удачно ориентированным, если его активный центр T1 находится достаточно близко к электроду для осуществления прямого переноса [19]. Медиаторный перенос электронов предполагает использование особых химических соединений – челноков, которые облегчают перенос электронов к иону меди T1 центра. Использование редокс-медиаторов позволяет проводить окисление соединений, которые не подвергаются окислению с участием только индивидуальных лакказ. Редокс-медиаторы являются низкомолекулярными субстратами лакказ, в результате ферментативного окисления которых образуются высокореакционные продукты, способные неферментативно окислять различные соединения, не являющиеся субстратами фермента [20]. С практической точки зрения, отсутствие окислительно-восстановительных посредников упрощает процесс изготовления биокатодов и устраняет их токсичное влияние, возникающие в результате возможного выделения дополнительных редокс-соединений.

Таким образом, кроме характеристик самого фермента, важным является способ его иммобилизации на поверхности электрода. Не существует универсального метода иммобилизации ферментов и не может быть назван универсальный носитель для всех возможных способов применений [21]. Выбранный носитель должен быть нерастворимым и совместимым с лакказой, а также обязан поддерживать стабильность фермента в экспериментальных растворах. Следует также учитывать возможное неблагоприятное взаимодействие лакказы с поверхностью носителя [22]. Кроме того, для проведения биокаталитической реакции носитель не должен замедлять диффузию субстрата к активным центрам фермента. Непористые материалы имеют минимальное ограничение диффузии, но достигают ограниченной иммобилизации ферментов. Напротив, пористые материалы могут содержать большое количество фермента, но субстраты с большой молекулярной массой будут страдать от диффузионных ограничений [23]. Иммобилизация лакказы потенциально выгодна по сравнению со свободным ферментом, поскольку такая система проще и практичнее в эксплуатации и может обеспечить значительное снижение потерь фермента [24]. Кроме того, к преимуществам иммобилизации лакказы можно отнести термостабильность фермента, устойчивость фермента к экстремальным условиям и химическим реагентам, а также иммобилизованные лакказы могут быть легко отделены от продуктов реакции, что позволяет использовать ферменты в биореакторах непрерывного режима [23]. Для достижения оптимальной ориентации фермента при изготовлении биокатодов в БТЭ используют такие методы иммобилизации как адсорбция и ковалентное связывание.

Необходимо отметить, что даже несмотря на то, что лакказы может необратимо адсорбироваться на поверхности графита, данный метод иммобилизации основан на случайной адсорбции молекул на поверхности электрода, что может привести к полному отсутствию правильной ориентации фермента, и, как следствие, снижению эффективности транспорта электронов. Именно поэтому перед закреплением фермента проводят модификацию электродов с помощью наноструктурированных материалов. В частности, углеродные нанотрубки (УНТ) могут использоваться для электрохимического контакта с ферментами через их внутреннюю проводимость или через перенос электронов к ферментам, обеспечивающий скачкообразное перемещение электронов между иммобилизованными окислительно-восстановительными центрами. УНТ могут находиться в непосредственной близости к простетическому участку ферментов и, следовательно, добиваться прямого электронного переноса между ферментами и основной частью электродов [25].

Электроды также могут модифицированными различными полициклическими ароматическими соединениями. В качестве таких соединений могут использоваться аналоги субстрата лакказы (антрацен, антрахинон, нафталин), которые связываются с активными центрами ферментов, способствуя их правильной ориентации на поверхности электрода. Пример последнего – модификация графитовых поверхностей антраценовыми соединениями, которые эффективно связываются с лакказами [26]. Однако в приведенном примере электрохимический сигнал был низок из-за потери белка вследствие его денатурации или десорбции. Решением последней проблемы может быть использование ковалентной иммобилизации белка на поверхности.

Ковалентное прикрепление к электродам возможно путем формирования слоя карбоксильных (амино) групп и взаимодействием с амино (карбоксильной) группой биомолекулы с образованием амидной связи [27 – 29].

Термическое амидирование через прямую конденсацию карбоновых кислот и аминов, как правило, требует очень жестких условий ($T > 180\text{ }^{\circ}\text{C}$). Чтобы избежать денатурации белков используют активаторы карбоксильных групп. В качестве такого активатора чаще всего используют 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид – водорастворимый карбодиимид.

Другой способ ковалентного связывания лакказы с поверхностью электродов основан на образовании имино-связей между окисленным периодатом углеводным компонентом на поверхности молекулы лакказы и аминогруппами на поверхности электрода [27, 30].

Предполагается, что такой подход приведет к иммобилизации фермента с меньшим расстоянием между активным центром T1 и электродом для осуществления переноса электронов, чем при использовании водорастворимого карбодиимида (рис. 1).

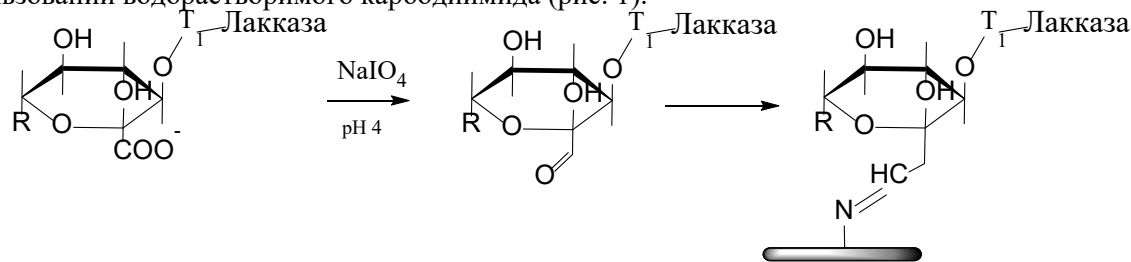


Рис. 1. Химическая модификация углеводных остатков в лакказе с последующей иммобилизацией на поверхности электродов

Кроме этих методов выделяют также механическое включение (захват) фермента на поверхности носителя, микрокапсулирование, при котором биоактивный агент заключается в ядре сфер микронного размера, изготовленных из полупроницаемого материала и самоиммобилизация фермента с формированием биопленки [31–34]

Ферменты лакказы имеют большой биотехнологический потенциал и перспективы применения для разработки биокатодов топливных элементов. Следует, однако, отметить, что их применение в качестве биокатализаторов восстановления кислорода ограничивается необходимостью разработки эффективных методов иммобилизации на поверхности электродов. Как уже было отмечено, не существует универсального метода иммобилизации лакказы. Выбранный метод должен обеспечивать стабильность фермента в течение длительного времени, и, что особенно важно, способствовать правильной ориентации фермента относительно поверхности проводника таким образом, чтобы обеспечить эффективный прямой перенос электронов к активным центрам фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meredith M.T., Minter, S.D. Biofuel cells: enhanced enzymatic bioelectrocatalysis. // *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2012. V. 5. P. 157–179. doi:10.1146/annurev-anchem062011-143049;
2. Yoshida H. Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the chemical society of Tokio // *J. Chem. Soc. Trans.* 1883. V. 43. P. 472–486;
3. Laccases. Anonymous Advances in Agricultural and Food Biotechnology. / Loera O., Pérez Pérez M., Irma Cristina. [et al]. // *Research Signpost.* 2006. P. 323–40;
4. Madhavi V., Lele S.S. Laccase: properties and applications. // *BioResour* 2009. V. 4. P. 1694–717;
5. Baldrian P. Fungal Laccases – Occurrence and Properties // *FEMS Microbiology Reviews.* 2006. V. 30. P. 215–242.
6. Thurston C.F. The Structure and Function of Fungal Laccases // *Microbiol. Rev.* 1994. V. 140. P. 19–26;
7. Claus H. Laccases: structure, reactions, distribution // *Micron.* 2004. V. 35. P. 93–96;
8. "Голубые" лакказы (обзор) / Морозова О.В., Шумакович Г.П., Горбачева М.А. [и др.] // *Биохимия.* 2007. Т. 72. Стр. 1136–1150;
9. Purification and preliminary crystallographic study of *Trametes versicolor* laccase in its native form / Bertrand, T., Jolival, C., Caminade, E., [et al]. // *Acta Cryst.* 2002. V.58. P. 319–321;
10. Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å resolution / Polyakov K.M., Fedorova T.V., Stepanova E.V. // *Acta Cryst.* 2009. V. 65. P. 611–617;
11. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. / Durán N., Rosa M.A., D'Annibale A. [et al]. // *Enzyme Microb Technol.* 2002. V. 31. P. 907–31;
12. Лакказа-медиаторные системы и их использование (обзор) / Морозова О.В., Шумакович Г.П., Шлеев С.В. [и др.] // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2007. Т. 43. Стр. 583–597;
13. Morozova, O.V. «Blue» laccases / O.V. Morozova // *Biochemistry.* – 2007. – V. 72. – № 10. – P. 1136–1128;
14. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. / Solomon E.I., Chen P., Metz M. [et al]. // *Angew Chem Int. Ed.* 2001. V. 40. P. 4570–4590;
15. High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix. / Reuillard B., Le Goff A., Agne's C. [et al]. // *Phys Chem.* 2013. V. 15. P. 4892–4896;
16. Gold nanoparticles as electronic bridges for laccase-based biocathodes. / Gutierrez-Sanchez C., Pita M., Vaz-Dominguez C. [et al]. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. P. 17212–17220;
17. Efficient direct oxygen reduction by laccases attached and oriented on pyrenefunctionalized polypyrrole/carbon nanotube electrodes. / Lalaoui N., Elouarzaki K., Le Goff A. et al. // *Chem. Commun.* 2013. V. 49. P. 9281–9283;
18. Improved chemical and physical stability of laccase after spherezyme immobilisation. / Jordaan J., Mathye S., Simpson C., Brady D. [et al]. // *Enzyme Microb Technol.* 2009. V. 45. N.432. P.5.
19. Application of eukaryotic and prokaryotic laccases in biosensor and biofuel cells: recent advances and electrochemical aspects. / Zhang, Y., Lv, Z., Zhou, J. [et al]. // *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2018;
20. Bourbonnais, R., Paice, M.G. // *FEBS.* 1990. V. 267. P. 99–102; Fabbrini, M., Gall, i C., Gentili, P. // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2002. V. 16. P. 231–240;
21. De Stefano L., Rea I., De Tommasi E., Rendina I., Rotiroli L., Giocondo M, et al. Bioactive modification of silicon surface using self-assembled hydrophobins from *Pleurotus ostreatus*. // *Eur Phys J.E.* 2009. V. 30. P. 181–5;
22. Silva C., Silva C.J., Zille A., Guebitz G.M., Cavaco-Paulo A. Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres. // *Enzyme Microb Technol.* 2007. V. 41. P. 867–75;
23. Arica M.Y., Altintas B., Bayramoglu G. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: application for textile dye degradation. // *Bioresour Technol.* 2009. V. 100. P. 665–9;
24. T. Beneyton, A. El Harrak, A.D. Griffiths. Immobilization of CotA, an extremophilic laccase from *Bacillus subtilis*, on glassy carbon electrodes for biofuel cell applications // *Electrochemistry Communications* 2011 V. 13 P.24–27;
25. Holzinger, M., Le Goff, A., and Cosnier, S. Carbon nanotube/enzyme biofuel cells. // *Electrochim. Acta.* 2012. V. 82. P. 179–190;
26. Blanford C.F., Heath R.S., Fraser A. A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O₂ reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface // *Chem. Commun.* 2007. P. 1710–1712;
27. C. Gutiérrez-Sánchez. Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods // *Electrochimica Acta* 2012. V. 82 P.218–223;
28. M. Bandapati, B. Krishnamurthy, S. Goel. Fully assembled Membraneless Glucose Biofuel Cell with MWCNT Modified Pencil Graphite leads as Novel Bioelectrodes. *IEEE Trans NanoBioscience* 2019;
29. Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high operational stability and resistance to chloride inhibition / Vaz-Dominguez C., Campuzano S., Rüdiger O. [et al]. // *Biosens Bioelectron* 2008. V. 24 P. 531–537;
30. G. Gupta, V. Rajendran, P. Atanassov. Bioelectrocatalysis of Oxygen Reduction Reaction by Laccase on Gold Electrodes // *Electroanalysis* 2004. V. 16 N. 13–14 P. 1182–1185;
31. Brady D., Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation. // *Biotechnol Lett.* 2009. V. 31. P. 1639–50;
32. Rochefort D., Kouisni L., Gendron K. Physical immobilization of laccase on an electrode by means of poly(ethyleneimine) microcapsules. // *J. Electroanal Chem.* 2008. V. 617. P. 53–63;
33. Crestini C., Perazzini R., Saladino R. Oxidative functionalisation of lignin by layer-by-layer immobilised laccases and laccase microcapsules. // *Appl. Catal. Gen.* 2010. V. 372. P. 115;
34. Jordaan J., Mathye S., Simpson C., Brady D. Improved chemical and physical stability of laccase after spherezyme immobilisation. // *Enzyme Microb Technol.* 2009. V. 45. N.432. P.5.
35. Исследование выполнено в рамках проекта по Государственному заданию МИНОБРНАУКИ (№ FEWG 2020–008).