

Таким образом ffEVs в среде созревания оказывает стимулирующее действие на компетентность ооцитов коров к последующему эмбриональному развитию. Позитивное влияние отмечается как на количественные, так и на качественные характеристики эмбрионального развития, что свидетельствует о положительном действии внеклеточных везикул на качество ооцитов, а также о возможности их использования на этапе экстракорпорального созревания для повышения эффективности технологии IVF.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 19-16-00115)

Литература

1. Lonergan P., Fair T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts // *Theriogenology*. 2008. Vol. 69. P. 17-22.
2. Stroebech L., Mazzoni G., Pedersen H.S., Freude K.K., Kadarmideen H.N., Callesen H., Hyttel P. In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology // *Animal Reproduction*. 2015. Vol. 12(3). P. 465-472. 1154.
3. Blanco M.R., Demyda S., Moreno Millán M., Genero E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review // *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 2011. Vol. 6(7). P. 155-165.
2. Buratini J., Price C.A. Follicular somatic cell factors and follicle development // *Reproduction, Fertility and Development*. 2011. Vol. 23(1). P. 32-9.
3. Hsueh A.J.W., Kawamura K., Cheng Y., Fauser B.C. Intraovarian control of early folliculogenesis // *Endocrine Reviews*. 2015. Vol. 36(1). P. 1-24.
4. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends // *Journal of Cell Biology*. 2013. Vol. 200(4). P. 373-83.
5. Tesfaye D., Hailay T., Salilew-Wondim D., Hoelker M., Bitseha S., Gebremedhn S. Extracellular vesicle mediated molecular signaling in ovarian follicle: Implication for oocyte developmental competence // *Theriogenology*. 2020. Vol. 150. P. 70-74.
6. Di Pietro C., Exosome-mediated communication in the ovarian follicle // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2016. Vol. 33(3). P. 303-311.
7. Tesfaye D., Gebremedhn S., Salilew-Wondim D., Hailay T., Hoelker M., Grosse-Brinkhaus C., Schellander K. MicroRNAs: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development // *Reproduction*. 2018. Vol. 155(3). P. R121-R135.
8. Сингина Г.Н., Лебедева И.Ю., Шедова Е.Н., Тарадайник Т.Е., Митяшова О.С., Цындрина Е.В., Данч С.С. Способность ооцитов коров к эмбриональному развитию при созревании в разных системах двухфазного культивирования // *Сельскохозяйственная биология*. 2017. Том. 52. № 4. С. 772-784.

УДК 577.15.08

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-1-58-60>

«НАФТИЛЬНЫЙ КЛЮЧ» К ПРЯМОМУ ЭЛЕКТРОННОМУ КОНТАКТУ: НАПРАВЛЕННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ МАЛЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛАККАЗ НА ЭЛЕКТРОД

К.А. Егоров, О.Н. Пономарева

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

Поиск устойчивых решений для энергетики стимулирует интерес к ферментам как источникам зелёной энергии, особенно при конструировании биотопливных элементов (БТЭ). Для БТЭ существует острая потребность в высокоэффективных кислородных катодах, так как медленная кинетика реакции восстановления кислорода (ОВК) является основным «узким местом», резко ограничивающим общую мощность элемента. В биологических системах эта проблема усугубляется необходимостью работы при нейтральном pH и уязвимостью биокатализаторов к побочным продуктам, таким как активные формы кислорода (АФК). Лакказы (пара-дифенол: кислород оксидоредуктазы, К.Ф.1.10.3.2) — перспективные кандидаты для биокатодов, поскольку обладают двумя важными свойствами: способностью к прямому переносу электронов (direct electron transfer, DET) [1] и возможностью восстановления молекулярного кислорода до воды, минуя образование свободных АФК,

разрушающих материалы электрода. Лакказы, относящиеся к числу наиболее распространённых и изученных медьсодержащих оксидаз (МСО), имеют уникальный активный центр с четырьмя атомами меди. Окисление субстрата происходит на Т1-центре (1 атом Cu), а восстановление кислорода — на тринуклеарном кластере, состоящем из Т2-центра (1 атом Cu) и Т3-центра (2 атома Cu). Специализированные сайты лакказ — высокоспецифичный Т1-центр и универсальный O₂-редуцирующий тринуклеарный кластер — обеспечивают этим ферментам невероятную гибкость в катализе. Это объясняет их широкое распространение у грибов, растений и прокариот, где они участвуют в таких процессах, как лигнификация, детоксикация и защита от патогенов.

Способность лакказ к DET представляет важное практическое преимущество, так как позволяет упростить БТЭ за счёт отказа от медиаторов. Это способствует снижению стоимости ферментативных устройств, расширению сферы их применения и увеличению срока службы катода. Однако стоит отметить, что данная способность лакказ имеет значительную ценность и как инструмент фундаментальных исследований. DET используется при детальном изучении корреляций между термодинамическими движущими силами (например, электрохимическим потенциалом) и кинетическими параметрами ферментативного катализа, такими как константы скорости каталитического оборота и константы связывания субстрата. Кроме того, возможность прямого электронного контакта позволяет определять окислительно-восстановительные потенциалы (E⁰) медных центров лакказы (Т1- и Т2-центра), что имеет принципиальное значение для расшифровки её каталитического механизма и направленной инженерии. Таким образом, прямой биоэлектрокатализ лакказ является важным инструментом изучения их электрохимических свойств и многообещающим подходом при разработке биокатализаторов БТЭ.

В последние годы исследователи проявляют повышенный интерес к малым бактериальным двухдоменным лакказам (SLAC), способным окислять фенольные субстраты при нейтральных и щелочных значениях pH, а также обладающим высокой устойчивостью к ингибированию галогенид-ионами и термостабильностью. Одной из ключевых отличительных черт двухдоменных лакказ по сравнению с трёхдоменными аналогами является их олигомерная структура: трёхдоменные лакказы представлены мономерами, в то время как двухдоменные ферменты имеют тримерную конформацию. Вследствие этого механизм внутримолекулярного переноса электронов в двухдоменных лакказах отличается от хорошо изученного процесса, характерного для трёхдоменных ферментов. Несмотря на значительный интерес к данному вопросу, информация о внутримолекулярном переносе электронов SLAC крайне ограничена, и в настоящее время удалось найти лишь несколько исследований, посвящённых этой теме [2–5]. В данных работах SLAC участвовал в DET, а максимальные токи зависели от типа и размера углеродных материалов, используемых для иммобилизации. Особый интерес представляет метод направленной иммобилизации SLAC с использованием промоторов, имитирующих субстрат, в работе [2]. Управление ориентацией фермента на электродной поверхности — эффективный подход для достижения DET. Стратегия, использованная в данной работе, основана на применении многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ), функционализированных нафтильными группами. Данная стратегия была ранее предложена для направленной иммобилизации трёхдоменных лакказ [6], где субстрат-подобное связывание с поверхностью электрода позволило увеличить степень DET. Однако олигомерное строение двухдоменных лакказ не позволяет напрямую экстраполировать полученные ранее результаты по DET трёхдоменных МСО на биоэлектрокаталитические системы с двухдоменными лакказами.

В данной работе проведено сравнительное исследование биоэлектрохимических свойств двух малых бактериальных лакказ, ScaSL (WP_086728190.1) и SoSL (WP_031060324.1), выделенных из *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ac-1300 и *Streptomyces ochraceiscleroticus* ВКМ Ac-651, соответственно. Ферменты, любезно предоставленные Трубищиной Л.И. (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН) [7], использовали для иммобилизации на многостенных углеродных нанотрубках (МУНТ) производства «Таунит-М» (ООО "Нанотехцентр", Тамбов, Россия), предварительно функционализированных нафтильными группами (далее – МУНТ_{нафт}). Для этого МУНТ_{нафт} диспергировали ультразвуком в присутствии ScaSL или SoSL, которые одновременно выступали в роли диспергаторов. Полученные суспензии наносили на очищенные и отполированные стеклоглеродные электроды и высушивали при комнатной температуре, получая модифицированные электроды МУНТ_{нафт}-ScaSL и МУНТ_{нафт}-SoSL. Биоэлектрокаталитическую активность полученных электродов исследовали методом циклической вольтамперометрии в аэробных и анаэробных условиях, в присутствии и в отсутствие медиатора электронного переноса – 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоной кислоты) (АБТС).

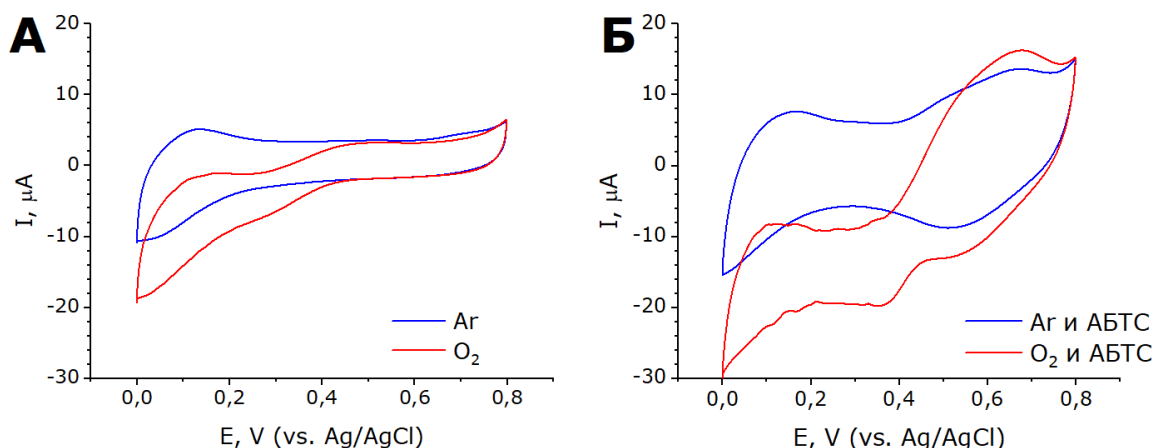


Рисунок 1. Циклические вольтамперограммы системы МУНТ_{нафт}-ScaSL в 20 мМ буфере Бриттона-Робинсона (рН 4.3): (А) прямой перенос электронов (ДЕТ), (Б) перенос, опосредованный АБТС (0.1 мМ). Измерения в среде, насыщенной кислородом, в диапазоне потенциалов 0 - +0,8 В при скорости развертки 10 мВ/с. Среду считали насыщенной кислородом после барботирования раствора воздухом в течение 15 минут, измерения в среде аргона – 30 минут.

Циклические вольтамперограммы электродов МУНТ_{нафт}-ScaSL и МУНТ_{нафт}-SoSL демонстрируют высокую степень сходства, что указывает на близкие биоэлектрохимические свойства иммобилизованных лакказ. Для обоих электродов зафиксирована выраженная волна восстановления кислорода в узком диапазоне потенциалов (+0.45 – +0.46 В), что является характерным признаком эффективного ДЕТ между электродом и Т1-центром лакказы (рис. 1А). Оценка доли правильно ориентированных молекул фермента, проведенная по соотношению прямого ДЕТ и опосредованного (через АБТС) переноса электронов, показала значение около 50% как для ScaSL, так и для SoSL (Рис. 1А, Б). Данный результат свидетельствует о значительной эффективности функционализации нафтильными группами в обеспечении направленной иммобилизации ScaSL и SoSL на поверхности МУНТ и указывает на перспективность использования субстрат-подобных соединений (таких как нафтильные группы) для направленной ориентации малых бактериальных лакказ и достижения ДЕТ. Несмотря на достигнутую эффективность, дальнейшая оптимизация требует углубленного изучения взаимосвязей между молекулярным строением ферментов (ScaSL, SoSL), распределением их поверхностного заряда и локализацией гидрофобных участков вблизи Т1-центра.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 24-14-20013 (<https://rscf.ru/project/24-14-20013/>) и при поддержке Комитета Тульской области по науке и инноватике.

Литература

1. Tarasevich M.R. et al. 293 - Electrocatalysis of a cathodic oxygen reduction by laccase // *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1979. Vol. 6, № 3. P. 393–403.
2. Lörcher S. et al. Direct Bio-electrocatalysis of O₂ Reduction by *Streptomyces coelicolor* Laccase Orientated at Promoter-Modified Graphite Electrodes // *ChemPhysChem.* 2013. Vol. 14, № 10. P. 2112–2124.
3. Han Z. et al. Comparative investigation of small laccase immobilized on carbon nanomaterials for direct bioelectrocatalysis of oxygen reduction // *Electrochem. Commun.* 2019. Vol. 101. P. 82–87.
4. Gallaway J. et al. Oxygen-reducing enzyme cathodes produced from SLAC, a small laccase from *Streptomyces coelicolor* // *Biosens. Bioelectron.* 2008. Vol. 23, № 8. P. 1229–1235.
5. Galai S., Korri-Youssoufi H., Marzouki M.N. Characterization of yellow bacterial laccase SMLAC /role of redox mediators in azo dye decolorization // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2014. Vol. 89, № 11. P. 1741–1750.
6. Ben Tahar A. et al. High catalytic performance of laccase wired to naphthylated multiwall carbon nanotubes // *Biosens. Bioelectron.* 2020. Vol. 151. P. 111961.
7. Trubitsina L.I. et al. A Novel Two-Domain Laccase with Middle Redox Potential: Physicochemical and Structural Properties // *Biochem. Mosc.* 2023. Vol. 88, № 10. P. 1658–1667.