

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЛАККАЗЫ БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ: НОВЫЕ ИСТОЧНИКИ СИНЕГО ФЕРМЕНТА ДЛЯ ЗЕЛеноЙ ХИМИИ И БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗА****О.Н. Понаморева<sup>1</sup>, Л.И. Трубицина<sup>2</sup>, А.В. Абдуллатыпов<sup>1,3</sup>, И.В. Трубицин<sup>1,2</sup>, С.В. Алферов<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия*<sup>2</sup>*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН – обособленное структурное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия*<sup>3</sup>*Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное структурное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия*

Лакказы (пара-бензендиол:кислород оксидоредуктаза, п-дифенолоксидаза, КФ 1.10.3.2) относятся к оксидоредуктазам и катализируют одноэлектронное окисление четырех субстратов из широкого спектра соединений (ароматических фенолов и их производных, азо-соединений, цианокомплексов с переходными металлами и др.) в сочетании с восстановлением молекулярного кислорода до воды. Эти ферменты относятся к суперсемейству медьсодержащих (мультимедных) оксидаз (МСО) и содержат четыре атома меди, организованные в одноядерный медный центр (Т1-центр) и трехядерный медный центр (два атома меди Т3 и один атом меди Т2). Расположенный близко к поверхности Т1 медный центр участвует в одноэлектронном окислении субстратов, тогда как трехядерный медный центр участвует в сопутствующем восстановлении O<sub>2</sub> до воды. Эти ферменты обнаружены у грибов, высших растений, бактерий и насекомых. Исчерпывающий анализ роли лакказы в различных таксонах позволяет сделать вывод, что эти ферменты эволюционировали, чтобы выполнять общую важную защитную функцию в живых системах. Лакказы, выделенные из различных источников, проявляют различные биохимические свойства из-за разной роли, которую они играют в этих организмах. Грибные лакказы функционируют в кислой среде (рН от 3,6 до 5,2) и в основном деградируют токсичные фенольные соединения. Растительные лакказы участвуют преимущественно в синтетических процессах, таких как образование лигнина. У насекомых они участвуют в биосинтезе коричневого меланиноподобного пигмента. В последнее время в качестве источников лакказы все чаще используются бактерии [1]. Бактериальные МСО с лакказной активностью признаны «moonlighting proteins» (т.е. многофункциональные ферменты с несколькими функциями в зависимости от их клеточной локализации), был выдвинут гипотетический механизм переключения многофункциональных ферментов. Они участвуют в деградации лигнина и других сложных полимеров, способствуя образованию гумуса; вовлечены в процессы детоксикации, устойчивости к металлам и защиты от УФ-излучения за счет синтеза пигментов, поэтому ожидается, что лакказы прокариот будут выдерживать такие суровые условия, как высокая температура, экстремальный рН и присутствие солей, что важно для промышленного применения [2].

Роль лакказ в природе и их способность восстанавливать кислород без образования промежуточных активных радикалов способствовали их широкому применению как катализаторов в различных процессах при разработке экологически безопасных альтернатив традиционным методам: - в экологической биотехнологии для деградации ксенобиотиков, обесцвечивания красителей, обезвреживания микотоксинов и антибиотиков; - в органическом синтезе при получении антимикробных соединений, полимеров с различными свойствами; - в пищевой промышленности для обесцвечивания соков, удаления кислорода, функционализации пищевых веществ, синтеза упаковочных материалов; - в биомедицине для получения биосовместимых материалов с антиоксидантными свойствами и для разработки биохимических методов анализа. Удивительной особенностью лакказ является их способность участвовать в прямом переносе электронов от электрода на медный центр белка и далее на кислород с образованием двух молекул воды в реакциях согласованного переноса электронов (биоэлектродкатализ). Биоэлектродкатализ при участии лакказ используют при разработке биокатодов биотопливных элементов (прямой биоэлектродкатализ) и биосенсоров для определения природных и синтетических фенолов, других некоторых других токсикантов при участии медиаторов электронного транспорта (медиаторный

биоэлектродкатализ) [3]. Следует отметить, что за пятидесятилетнюю историю по разработке лакказных катодов почти все исследования проведены с использованием высокопотенциальных грибных лакказ, которые являются трехдоменными (3д) белками и активны в виде мономера. Это касается не только биоэлектродкатализа, но и других сфер применения медьсодержащих лакказ. В отличие от них бактериальные двухдоменные (2д) лакказы или, так называемые, малые лакказы (small laccase, SLAC), проявляют каталитическую активность в виде тримера, что обеспечивает этим белкам особые свойства, которые отмечались выше. Тримерная организация фермента и относительная близость ионов меди T1 сближают три центра связывания субстрата. Фактически, на поверхности фермента формируется неглубокий тримерный центр связывания субстрата глубиной около 8 Å [4]. Во внутримолекулярном переносе электрона в олигомере участвует T1-центр одного мономера (протомера) и T2-T3-кластер другого мономера (протомера). Однако механизмы внутримолекулярного переноса электронов и биоэлектродкатализа при участии двухдоменных лакказ практически не изучены. С развитием методов молекулярной биотехнологии, биоинформатики и нанотехнологий интересы исследователей смещаются в сторону исследований по получению малых лакказ с улучшенными характеристиками. Еще одним направлением по получению ферментов с улучшенными потребительскими характеристиками является поиск новых источников МСО среди теромостабильных и галотолерантных прокариот (бактерий и архей) [4]. В настоящее время описано лишь несколько рекомбинантных медьсодержащих оксидаз архей с лакказной активностью и известной структурой: McoP из *Pyrobaculum aerophilum* ранее считавшимся единственным МСО-подобным белком, и LccA, выделенная из *Haloferax volcanii*. Таким образом, поиск и направленный дизайн медьсодержащих оксидаз прокариот, с одной стороны, и исследование механизмов электронного транспорта у этих ферментов, с другой стороны, является перспективным направлением исследований по разработке биокатализаторов для зеленой химии и биоэлектродкатализа.

Новая идея этого исследования состоит в том, чтобы найти белки некоторых бактерий и архей, аннотированные как МСО с улучшенными характеристиками (стабильность при физиологических условиях, более высокий окислительно-восстановительный потенциал редокс-центра, эффективность в процессах прямого переноса электронов (ППЭ) и др.).

При выборе микроорганизмов для поиска целевых генов МСО выбирали галотолерантные штаммы, исходя из солёности питательных сред, рекомендованных для их выращивания. В случае, если стандартная среда для выращивания содержала более 35 г/л NaCl (солёность Мирового океана), организмы относили к галофилам. Другим критерием для выбора стала возможность получить штаммы для исследования из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино) (<https://www.vkm.ru/rus/Catalogue.htm>). В итоге, в качестве носителей генов МСО отобраны представители одного класса архей и трёх классов бактерий, принадлежащих к двум крупнейшим типам – *Actinomycetota* и *Pseudomonadota*. На основе анализа белковых последовательностей на наличие консервативных медь-связывающих аминокислот отобрано 11 штаммов микроорганизмов, в которых обнаружено 16 генов МСО (из них 12 генов 3д-лакказ, и по два гена 2д-лакказы и билирубиноксидазы). Поскольку выбранные штаммы бактерий относятся к крупнейшим типам, сформированная выборка может описывать значительную долю всего разнообразия галофильных микроорганизмов как источников лакказ, т.е. является достаточно репрезентативной. В результате серии ПЦР удалось получить 13 ампликонов, которые соответствовали по величине выбранным генам. Для получения целевых белков использовали методологию гетерологичной экспрессии генов в бактериальных системах на основе нескольких штаммов *E.coli* (*E. coli* BL21 Star™ (DE3), *E. coli*: BL21-CodonPlus(DE3), *E. coli*: Origami B(DE3), *E. coli*: Rosetta™(DE3)) и экспрессионных векторов двух серий (pET и pQE). После клонирования целевых генов медьсодержащих оксидаз в экспрессионных векторах удалось получить 25 генетических конструкций (таблица 1), но только пять из них после экспрессии в компетентных клетках продемонстрировали лакказную. Подбор условий экспрессии (содержание индуктора, ионов меди, хлорида натрия, режимы культивирования, использование дополнительных плазмид с генами шаперонов) позволило увеличить выход белков H11, H14, Hg1, Hg2, Ht6, но пока не удалось добиться с высокой лакказной активности в растворимой фракции белка.

Таблица 1 – Генетические конструкции для клонирования генов медьсодержащих оксидаз прокариот\*

Фермент /Экспрессионный вектор	pQE-30	pET-19mod	pET-22b(+)	pET-28a(+)
Билирубиноксидаза из <i>Haloferax gibbonsii</i> (Hg1)		+	+	+
2д-Лакказы из <i>H. gibbonsii</i> (Hg2)	++			++
Билирубиноксидаза из <i>H. lacusprofundi</i> (Hl1)		+	+	+
3д-Лакказы из <i>H. lacusprofundi</i> (Hl4)		+	+++	+++
3д-Лакказы из <i>H. turkmenica</i> (Ht4)			+	
3д-Лакказы из <i>H. turkmenica</i> (Ht6)		+	+	+
3д-Лакказы из <i>K. sedentarius</i> (Ks)				+
3д-Лакказы из <i>M. maris</i> (Marv2)				+
3д-Лакказы из <i>S. socius</i> (Ss)				+
3д-Лакказы из <i>W. maritima</i> (Wm)				+

\*«+» обозначена одна генетическая конструкции

Параллельно изучали свойства природных 2д-лакказ актинобактерий (CjSL *Catenuloplanes japonicus* VKM Ac-875; ScaSL *Streptomyces carpinensis* VKM Ac-1300; SoSL *Streptomyces ochraceiscleroticus* VKM Ac-651), полученных в гетерологичных системах экспрессии, разработанных ранее для генов малых лакказ [5, 6], и возможности сайт-направленного мутагенеза для улучшения свойств ферментов [7]. Недавно выделенная лакказа ScaSL - первая среднепотенциальная двухдоменная лакказа, которую удалось обнаружить в природе. В отличие от других двухдоменных лакказ этот фермент содержал «низкопотенциальную» аминокислоту метионин в качестве аксиального лиганда медного сайта T1, но спектр окисляемых ими субстратов был шире, чем у низкопотенциальных лакказ. Таким образом, существуют определенные аминокислоты, которые могут вносить вклад в повышенный окислительно-восстановительный потенциал этих ферментов и способность окислять субстраты. Бактериальную 2д-лакказу впервые использовали как биокатализатор в реакции окисления феруловой кислоты для нуклеофильной кросс-сшивки хитозана в нейтральной среде. Предложены условия реакции, при которых удастся обеспечить высокую степень сшивки хитозана (до 85%) (в печати). Модифицированный феруловой кислотой хитозан с высокой степенью сшивки является перспективным материалом для создания антимикробных и антиоксидантных гидрогелей и полимерных пленок для применения в медицине и пищевой промышленности

Сайт-направленный мутагенез ScaSL проводили для выявления детерминант, расположенных на периферии медного центра T1, которые могут влиять на конформацию белка, доступность активных центров лакказы для субстратов, включая молекулярный кислород, и, как следствие, на редокс-потенциал ScaSL. Для выбора позиций для мутаций провели множественное выравнивание средне- и низкопотенциальных двухдоменных лакказ, и анализ трехмерной структуры лакказы. В качестве потенциальных позиций для мутаций выбраны два аминокислотных остатка фенилаланина, которые присутствуют в ScaSL, но отсутствуют в двухдоменных лакказах с низким редокс-потенциалом. Эти остатки расположены в кармане связывания субстрата лакказы и относятся ко второй координационной сфере T1-центра. Их замена на тирозин (F232Y/F233Y) должна сделать поверхность, взаимодействующую с субстратом, более гидрофильной (что наблюдается у большинства двухдоменных лакказ с низким редокс-потенциалом) и более полярной без существенного уменьшения размера л-электронного облака. Эти остатки аминокислот локализованы в центре тримера, и их изменение может нарушить гидрофобное ядро межсубъединичного взаимодействия в тримере. Мы предполагали, что замена фенилаланинов на тирозины в лакказе приведет к снижению его окислительно-восстановительного потенциала. Однако в случае с мутантом F232Y/F233Y этого не произошло. Напротив, мутация повлияла на pH и термостабильность фермента [7]. Анализ аминокислотной последовательности 2д-лакказ актиномицетов позволил обнаружить природный фермент с тирозинами вместо фенилаланинов в указанных положениях. Клонирование и экспрессия гена позволила наработать и охарактеризовать рекомбинантную лакказу SoSL. Оказалось, что обе природные лакказы ScaSL (F232/F233) и SoSL (Y232/Y233) способны к эффективному прямому биоэлектрокатализу, когда белки иммобилизованы на нафтилированных многостенных углеродных нанотрубках (МУНТ), в отличие от окисленных МУНТ (в печати). Более того, обе лакказы, иммобилизованные на нафтилированных МУНТ, демонстрировали начало восстановления молекулярного кислорода уже

при потенциале около +0,6 В (относительно NHE), что значительно выше, чем можно было бы ожидать даже для средне-потенциальных лакказ (рисунок 1). Высокий потенциал начала восстановления кислорода и высокая термическая стабильность иммобилизованной на электроде лакказы (сохраняла 50% активности после выдерживания лакказного электрода при 90 °С в течение 1 часа) позволяют заключить, что 2д-лакказы являются хорошими кандидатами для дальнейших исследований по разработке биокатодов.

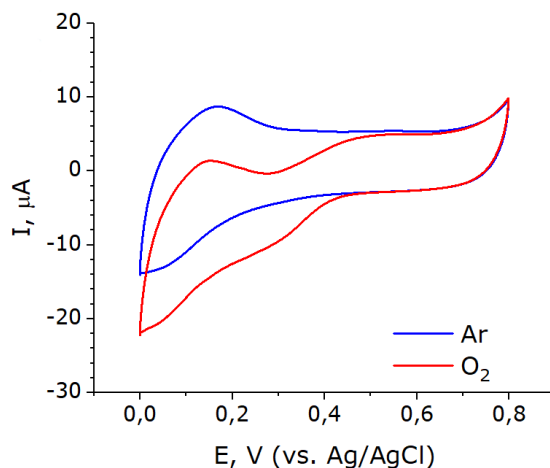


Рисунок 1. Циклическая вольтамперограмма стеклоуглеродного электрода, модифицированного нафтилированными МУНТ с иммобилизованной лакказой SoSL в стандартной трехэлектродной системе (скорость сканирования 10 мВ/с, рН 3.9)

**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. Khatami S.H., Vakili O., Nazmara Z., Movahedpour A., Ghasemi H., Taheri-Anganeh M., Mortazavi S.S., Savardashtaki A. Laccase: Various types and applications // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2022. V. 69. № 6. P. 2658–2672.
2. Kaur R., Kaur H., Sharma P., Kumar R., Krishna B.B., Bhalla T.C., Kaur J. Structural properties, genomic distribution of laccases from *Streptomyces* and their potential applications // *Process Biochemistry*. 2022. V. 118. P. 133–144.
3. Dey B., Dutta T. Laccases: Thriving the domain of bio-electrocatalysis // *Bioelectrochemistry*. 2022. V. 146. P. 108144.
4. Tominaga M., Sato Y., Matsumoto K., Ishizuka M., Shirai O. Temperature depending bioelectrocatalysis current of multicopper oxidase from a hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum* // *Electrochemistry Communications*. 2021. V. 125. P. 106982.
5. Skálová T., Dohnálek J., Østergaard L.H., Østergaard P.R., Kolenko P., Dušková J., Štěpánková A., Hašek J. The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases // *Journal of Molecular Biology*. 2009. V. 385. № 4. P. 1165–1178.
6. Trubitsina L.I., Demidova E.V., Trubitsin B.V., Pozdnyakova N.N., Balakshin V.Y., Koroleva O.V., Tishchenko S.V. Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes // *PeerJ*. 2021. V. 9. P. e11646.
7. Trubitsina L.I., Ignatov V.V., Koroleva I.K., Kolomytseva M.P. A novel two-domain laccase with middle redox potential: Physicochemical and structural properties // *Biochemistry (Moscow)*. 2023. V. 88. № 10. P. 1658–1667.
8. Trubitsina L., Demidova E., Shashkov I., Tishchenko S. Site-directed mutagenesis of two-domain laccase ScaSL for obtaining a biocatalyst with improved characteristics // *Catalysts*. 2024. V. 14. № 11. P. 694.