

УДК 577.152.3

СПЕКТРАЛЬНОЕ И ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛАККАЗ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

С.В. Шлеев¹, Е.А. Зайцева², Е.С. Горшина³, О.В. Морозова¹, В.А. Сереженков⁴,
Д.Ш. Бурбаев⁴, Б.А. Кузнецов¹, А.И. Ярополов¹

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, e-mail: shleev@inbi.ras.ru; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, e-mail: zai@enz.chem.msu.ru; ³Федеральное государственное унитарное предприятие "ГосНИИСинтезбелок"; ⁴Институт химической физики РАН)

В работе получены новые данные по основным электрохимическим и спектральным свойствам голубых лакказ трех видов базидиальных грибов: *Coriolus zonatus*, *Coriolus hirsutus* и *Cerrena maxima*. Показано, что лакказа *Coriolus zonatus* обладает рядом аномальных параметров, что, возможно, связано со строением активного центра фермента. Выведено уравнение, описывающее зависимость кажущегося окислительно-восстановительного потенциала фермента от соотношения окисленных и восстановленных форм белка в растворе.

Лакказа (*n*-дифенол:кислород оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) катализирует окисление *орто*-, *пара*-дифенолов, аминафенолов, полифенолов, полиаминов, лигнинов, а также некоторых неорганических ионов с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды [1–3].

Известно, что в состав лакказы входят 4 иона меди, находящиеся в различном окружении. По принятой классификации эти активные центры делятся на три типа: Т1, Т2, Т3 [1, 2, 4, 5]. Для некоторых лакказ строение активных центров и их свойства хорошо изучены [1–3, 5–9]. Показано, что медь первого типа обеспечивает голубой цвет фермента. Данный центр на спектрах поглощения характеризуется максимумом поглощения в области 600 нм, а ЭПР-спектры характеризуются следующими параметрами: $g_{\parallel} \approx 2,2$ и $A_{\parallel} = 43\text{--}9510^{-4} \text{ см}^{-1}$. Медь второго типа спектрофотометри-

чески не детектируется, но обеспечивает характерный ЭПР-спектр лакказ ($g_{\parallel} \approx 2,3$; $A_{\parallel} 160\text{--}210 \cdot 10^{-4} \text{ см}^{-1}$). Биядерный медный кластер (медь третьего типа) диамагнитен. На спектре поглощения он обеспечивает плечо в области 330 нм, для него также характерны спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции [7, 9].

Одной из важнейших характеристик лакказы является стандартный редокс-потенциал Т1-центра фермента. Ранее было показано, что эффективность катализа окисления некоторых субстратов зависит от потенциала Т1-центра [10, 11]. Поэтому лакказы с высоким окислительно-восстановительным потенциалом представляют значительный интерес. В настоящий момент редокс-потенциал Т1-центра определен у значительного числа ферментов этого класса, выделенных из различных источников, и составляет от 420 до 770 мВ [11–15]. Одним из критериев эффективности действия

лакказ является изучение их электрокаталитической активности в реакциях восстановления кислорода. Так, в работе [16] было показано, что потенциал начала электровосстановления кислорода на электроде с адсорбированной лакказой зависит от используемого фермента.

Возможности широкого использования лакказ в биотехнологических системах требуют как проведения поиска и изучения новых ферментов, так и дальнейшего накопления и систематизации экспериментальных данных по уже описанным лакказам.

Целью настоящей работы являлось изучение окислительно-восстановительных и спектральных свойств активных центров “голубых” лакказ трех базидиальных грибов, а также систематизация и последующее сравнение основных характеристик данных ферментов.

Методы исследования

Штаммы-продуценты внеклеточной лакказы *Coriolus hirsutus*, *Coriolus zonatus* были предоставлены из лабораторной коллекции Федерального государственного унитарного предприятия “ГосНИИсинтезбелок”. Частично очищенный препарат внеклеточной лакказы *Cerrena maxima* был предоставлен доктором О.В. Королевой и доктором В.П. Гавриловой в рамках проведения совместных исследований по гранту INCO Copernicus № ICA2-CT-2000-10050. Культивирование базидиомицетов *Coriolus hirsutus* и *Coriolus zonatus*, а также получение гомогенных по SDS-электрофорезу препаратов лакказ осуществляли по ранее описанным методикам [8, 15].

Все виды колоночной хроматографии низкого давления проводили с помощью комплекта стандартного оборудования для жидкостной хроматографии низкого давления фирмы (“LKB”, Sweden) при температуре 4°. Для проведения жидкостной хроматографии высокого давления использовали HPLC-system “Стайер” (“Аквилон”, Россия) при температуре 20°.

Спектры оптического поглощения записывали на спектрофотометре “Hitachi-557”, спектры флуоресцен-

ции и возбуждения флуоресценции на спектрофлуориметре MPF-4 (“Hitachi”, Япония). Спектры ЭПР регистрировали на ЭПР-спектрометре ESC-106 (“Bruker”, Германия).

Для измерения и контроля pH использовали микроэлектрод и иономер “Orion” 701A (США).

Изоэлектрофокусирование проводили по методу [17] при естественном градиенте pH, стабилизированном глицерином.

Для определения потенциала T1-центра лакказ использовали метод окислительно-восстановительного титрования, описанный в работе [15].

Циклические вольтамперограммы с адсорбированными лакказами записывали в 0,1 М цитрат-фосфатном буфере при разных значениях pH на вольтамперометрическом анализаторе CV-50W (“BAS”, США). Адсорбцию фермента проводили на рабочем электроде из спектрального графита (*Ringsdorff Werke GmbH, Bonn, Germany, type RW001, 3.05 diameter*), как описано в работе [16]. В качестве электрода сравнения использовали хлорсеребряный электрод “BAS”, в качестве вспомогательного электрода – платиновую проволочку.

Белок определяли спектрофотометрическим методом, описанным в работе [18]. Для приготовления всех растворов использовали воду “Milli Q”.

Реактивы, использованные в работе: Тоуорепарл HW-55 (“Toyo Soda”, Япония); 2-меркаптоэтанол (“Ferak”, ФРГ); амфолины (“LKB”, Швеция); трис, глицин (“ICN”, США); кумасси голубой G-250 и R-250, наборы белков-метчиков для гель-хроматографии и электрофореза (“Serva”, ФРГ); Сервацел ДЕАЕ 52, акриламид, N,N-метиленабисакриламид, аммоний надсерноокислый (“Reanal”, Венгрия) (реактивы для электрофореза (“Reanal”) были предварительно перекристаллизованы); catechol (“Sigma”, USA); 2,2'- бихинолин, Na₂HPO₄, K₃Fe(CN)₆, K₄Fe(CN)₆ (“Merck”, ФРГ); глицерин, уксусная кислота, метанол, этанол, MoO₂, HCl, H₃PO₄, Na₂CO₃, KH₂PO₄, KCl, (NH₄)₂SO₄ (отечественные препараты марки “ос.ч” и “х.ч.”).

Т а б л и ц а 1

Основные характеристики окислительно-восстановительного титрования лакказ (пояснения в тексте)
b – угол наклона кривой титрования

Лакказа	E^0 , (мВ) T1 (pH 6,0)	b (мВ)	Отношение концентраций (медиатор/лакказа)	E^0 , O ₂ (мВ) (pH 3,0)
<i>Coriolus zonatus</i>	805	32	50/1	770
<i>Coriolus hirsutus</i>	800	49	100/1	800
<i>Cerrena maxima</i>	750	56	120/1	760

Т а б л и ц а 2

Спектральные параметры Т1-, Т2- и Т3-центров лакказ, полученные на основании данных спектрофотометрии, ЭПР- спектроскопии и флуоресцентного анализа

Лакказа	Т1 (спектрофотометрия и ЭПР)			Т2 (ЭПР)		Т3 (флуоресценция)	
	Максимум поглощения (нм)	g_{\parallel}	A_{\parallel} (см ⁻¹)	g_{\parallel}	A_{\parallel} (см ⁻¹)	Максимум испускания (нм)	Максимум возбуждения (нм)
<i>Coriolus zonatus</i>	608	2,20	$94 \cdot 10^{-4}$	2,24	$194 \cdot 10^{-4}$	422	315
<i>Coriolus hirsutus</i>	607	2,19	$95 \cdot 10^{-4}$	2,26	$186 \cdot 10^{-4}$	418	344
<i>Cerrena maxima</i>	607	2,18	$94 \cdot 10^{-4}$	2,24	$193 \cdot 10^{-4}$	425	322

Результаты и их обсуждение

По ранее разработанным методикам были получены в гомогенном состоянии лакказы *Coriolus zonatus*, *Coriolus hirsutus* и *Cerrena maxima*.

Были определены потенциалы меди первого типа данных ферментов (табл. 1). Показано, что исследуемые лакказы относятся к группе высокопотенциальных лакказ и поэтому могут с успехом использоваться в разных областях биотехнологии.

Установлено, что для лакказ угол наклона прямой $E - \lg[\text{Ox/Red}]$ титрования составляет от 49 мВ (для *Coriolus hirsutus*) до 56 мВ (для *Cerrena maxima*), т.е. около 59 мВ (табл. 1). Можно предположить, что протекает одноступенчатый, одноэлектронный процесс восстановления меди первого типа. Это хорошо согласуется с литературными данными, полученными для лакказ из других источников [1, 2, 11–15].

Было показано, что процесс титрования центра Т1 лакказы *Coriolus zonatus* по своим параметрам значительно отличается от процесса титрования ферментов из других источников (табл. 1). Угол наклона прямой $E - \lg[\text{Ox/Red}]$ составляет приблизительно 32 мВ, что указывает на сложный характер электронного переноса с участием центра Т1 данного фермента. На основании литературных данных можно предположить, что процесс восстановления меди Т1-центра является двухступенчатым. Двустадийность процесса восстановления и высокий окислительно-восстановительный потенциал Т1-центра лакказы *Coriolus zonatus* связаны, возможно, с аномальными характеристиками лигандного окружения меди в активном центре фермента. Уменьшение угла наклона линейного участка кривой титрования

может быть связано с тем, что имеет место реакция, не относящаяся к непосредственному восстановлению иона меди. Известно, что электродные процессы с участием сложных органических соединений могут протекать при наличии предшествующей или последующей неэлектрохимической реакции, что отражается на углах наклона участков кривых в координатах $E - \lg[i]$, где E – редокс-потенциал электрода, а i – плотность тока [19]. Необходимо отметить, что при окислительно-восстановительном титровании регистрации тока не происходит, поэтому применение приведенных в данной работе уравнений неправомерно. В настоящей работе выведено уравнение, отражающее возможное влияние неэлектрохимической стадии на угол наклона кривой титрования.

Для выяснения строения активных центров лакказ из базидиомицетов *Coriolus zonatus*, *Coriolus hirsutus* и *Cerrena maxima* были проведены их спектроскопические исследования. Спектры поглощения лакказ, используемых в настоящей работе, типичны для нативных голубых лакказ базидиальных грибов. В них присутствуют сигналы обоих центров меди (Т1 и Т3). Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции (Т3-центр), а также ЭПР-спектры (рис. 1) лакказ *Coriolus zonatus*, *Coriolus hirsutus* и *Cerrena maxima* также незначительно различаются между собой. Данные по спектральным характеристикам ферментов представлены в табл. 2.

Таким образом, несмотря на имеющиеся отличия в спектральных параметрах исследуемых ферментов можно утверждать, что общий характер строения активных центров всех исследованных голубых лакказ, содержащих в своем составе 4 атома меди, приблизительно одинаков.

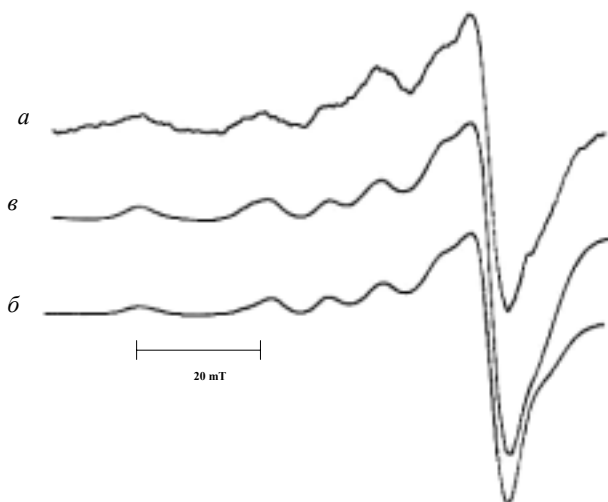
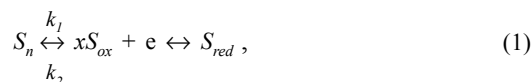


Рис. 1. ЭПР-спектры лакказ *Coriolus zonatus* (а), *Cerrena maxima* (б) и *Coriolus hirsutus* (в); 0,1 М фосфатный буфер pH 6,0; X – диапазон, микроволновая мощность 20 мВ; амплитуда модуляции 0,5; температура 77 К (а – усиление $1 \cdot 10^{-4}$, 8 накоплений; б – усиление $1 \cdot 10^{-4}$, 4 накопления; в – усиление $1 \cdot 10^{-4}$, 8 накоплений)

Ранее в литературе было высказано предположение о существовании в растворе двух форм лакказы – активной и неактивной [1]. Природа форм и их взаимные превращения окончательно не выяснены. Однако можно предположить, что при наличии в растворе неактивной формы фермента окислительно-восстановительное титрование лакказ может осуществляться по следующей схеме:



где S_n – неактивная форма, S_{ox} – активная окисленная форма, S_{red} – восстановленная форма лакказы, x – коэффициент.

Легко показать, что с учетом наличия в растворе нескольких форм фермента (например, активной и неактивной), в простейшем случае зависимость кажущегося окислительно-восстановительного потенциала от соотношения окисленных и восстановленных форм фермента преобразуется в следующее уравнение:

$$E = E^0 + (RT/F) \ln \left[\frac{x/k(S_{ox})^x + S_{ox}}{x/k((S_{ox}^0)^x - (S_{ox})^x) + S_{ox}^0 - S_{ox}} \right], \quad (2)$$

где k – константа равновесия процесса перехода активной и неактивной формы фермента друг в друга ($k = k_1/k_2$).

Очевидно, что множитель x/k влияет на множитель RT/F , а значит и на наклон кривой редокс-титрования исследуемых ферментов.

Среди изученных лакказ наиболее высокий потенциал меди первого типа имеет лакказа *Coriolus zonatus* [1, 2, 11–15]. Определение редокс-потенциалов меди первого типа лакказ из разных источников необходимо для выявления наиболее высокопотенциальных ферментов, которые, участвуя в реакциях окисления субстратов, приводят к образованию высокопотенциальных интермедиатов.

Одним из критериев ферментативной эффективности лакказ является изучение их электрокаталитической активности в реакциях восстановления кислорода. Для исследования этого процесса на графитовом электроде с адсорбированной лакказой в растворе, насыщенном кислородом, использовали метод циклической вольтамперометрии.

На рис. 2 представлены циклические вольтамперограммы, записанные на электродах из спектрального графита в насыщенном кислородом цитрат-фосфатном буфере (вольтамперные кривые электрода спектрального графита с адсорбированной лакказой *Coriolus hirsutus* не представлены). Как видно из табл. 1, значения окислительно-восстановительных потенциалов меди типа T1 и начальные потенциалы электровосстановления кислорода на электродах с адсорбированными лакказами близки. Совпадение значений окислительно-восстановительного потенциала центра T1 фермента и потенциала электровосстановления кислорода для большинства лакказ можно объяснить тем, что именно ион меди центра T1 является первичным акцептором электронов в молекуле фермента. Из полученных данных можно сделать вывод о том, что ферментативный процесс электровосстановления кислорода для конкретной лакказы определяется потенциалом меди типа T1.

Таким образом, в биотехнологических целях более рационально использовать высокопотенциальные грибные ферменты, так как в этом случае ферментативный процесс окисления смещается в область, более близкую к равновесному кислородному потенциалу, что дает основание перейти к исследованию широкого круга органических и неорганических соединений для ферментативного получения высокопотенциальных интермедиатов. Последние могут найти широкое промышленное применение при ферментативной деградации ксенобиотиков, при органическом синтезе, а также могут быть использованы в разных аналитических системах.

Авторы выражают благодарность доктору О.В. Королевой и доктору В.П. Гавриловой за предоставление препарата внеклеточной лакказы *Cerrena maxima*.

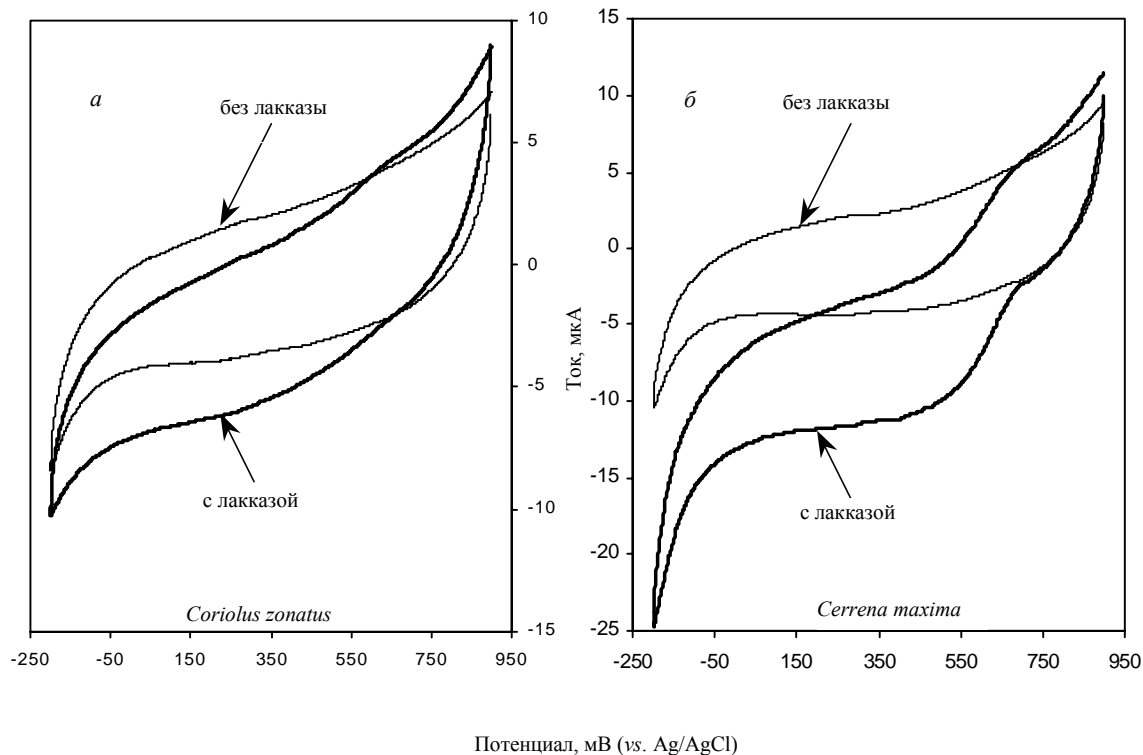


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы электровосстановления кислорода на графитовом электроде с адсорбированными лакказами *Coriolus zonatus* (а) и *Cerrena maxima* (б) в насыщенном кислородом буфере (0,1 М цитрат-фосфатный буфер pH 3,0; скорость развертки потенциала 10 мВ/с⁻¹)

Работа выполнена при поддержке грантов INCO-Cornericus (контракт № ICA2-СТ-2000-10050), ФЦНТП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники” (контракт № 43.073.1.1.2505), а также РФФИ, грант № 02-04-48885.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Solomon E.I., Sundraham U.M., Machonkin T.E. // Chem. Rew. 1996. **96**. P. 2563.
- The Enzymes // Ed. by P.D. Boyer. N.Y. etc.: Acad. Press, 1981. V. XII. Part B. P. 557.
- Yaropolov A.I., Skorobogat'ko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeyev S.D. // Appl. Biochem. Biotech. 1994. **49**. P. 257.
- Хьюз М. Неорганическая химия биологических процессов. М., 1983. С. 209.
- Лихтенштейн Г.И. Многоядерные окислительно-восстановительные металлоферменты. М., 1979. С. 236.
- Messerschmidt A., Huber R. // Eur. J. Biochem. 1990. **187**. P. 341.
- Shin K-S., Lee Y-J. // Archives of Biochem. Biophys. 2000. **384**. P. 109.
- Koroleva O., Stepanova E., Gavrilova V., Morozova O., Lubimova N., Dzchafarova A., Yaropolov A., Makower A. // J. Biotech. Applied Biochem. 1998. **28**. P. 47.
- Wynn R.M., Sarkar H.K., Holwerda R.A., Knaff D.B. // FEBS Letters. 1983. **156**. P. 23.
- Xu F., Kulis J.J., Duke K., Li K., Krikstopaitis K., Deussen H.-J.W., Abbate E., Galinyte V., Schneider P. // Applied Environ. Microbiol. 2000. **66**. P. 2051.
- Xu F., Shin W., Brown S.H., Wahleithner J.A., Sundaram U.M., Solomon E.I. // Biochem. Biophys. Acta. 1996. **1292**. P. 303.
- Reinhammar B. // Biochem. Biophys. Acta. 1972. **275**. P. 245.
- Xu F., Palmer A.E., Yaver D.S., Berka R.M., Gambetta G.A., Brown S.H., Solomon E.I. // J. Biol. Chem. 1999. **274**. P. 12372.
- Schneider P., Caspersen M.B., Mondorf K., Halkier T., Skol L.K., Ostergaard P.R., Brown K.M., Brown S.H., Xu F. // Enzyme Microb. Technol. 1999. **25**. P. 502.
- Koroleva O.V., Yavmetdinov I.S., Shleev S.V., Stepanova E.V., Gavrilova V.P. // Biochimia. 2001. **66**. P. 762.
- Yaropolov A.I., Kharybin A.N., Emneus J., Marko-Varga G., Gorton L. // Bioelectrochem. Bioenerg. 1996. **40**. P. 49.
- Vesterberg O., Svensson H. // Acta Chem. Scand. 1966. **20**. № 3. P. 820.
- Ehresmann B., Imbault P., Well J.H. // Analyt. Biochem. 1973. **54**. P. 307.
- Галуэ З. Теоретические основы электрохимического анализа. М., 1974. С. 296.