

УДК 577. 152.192.3.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ С УЧАСТИЕМ ВЫСОКО- И НИЗКОПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ГРИБНЫХ И ДРЕВЕСНОЙ ЛАККАЗ В ГОМОГЕННЫХ И ГЕТЕРОГЕННЫХ РЕАКЦИЯХ

М.А. Горбачева¹, Г.П. Шумакович¹, О.В. Морозова¹, А.В. Стрельцов¹,
Е.А. Зайцева², С.В. Шлеев¹

(¹Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ²кафедра химической энзимологии; e-mail: gorbacheva-marina@yandex.ru)

Проведено сравнение гомогенных каталитических и гетерогенных биоэлектродокаталитических свойств высокопотенциальных грибных и низкопотенциальной древесной лакказ. Показано принципиальное различие в каталитической активности по субстратам-донорам электронов и донорам атомов водорода и электронов для грибных и древесных лакказ при различных значениях рН, а также в биоэлектродокаталитической реакции восстановления молекулярного кислорода. Высказано предположение о зависимости различия между биокаталитическими свойствами изученных ферментов и их ролью в процессах метаболизма лигнина.

Лакказы (*n*-дифенол:кислород оксидоредуктаза, КФ 1.103.2) относятся к группе “голубых” оксидаз и катализируют реакции окисления широкого круга органических и неорганических субстратов молекулярным кислородом с сопутствующим восстановлением последнего до воды, минуя стадию образования пероксида водорода [1, 2]. В активный центр лакказ входят четыре иона меди, координированное взаимодействие которых приводит к сопряжению процесса одноэлектронного окисления субстратов-доноров с четырехэлектронной реакцией восстановления дикислорода. Ионы меди принято разделять на три типа: Т1 – “голубой” медный центр, характеризующийся полосой поглощения на электронных спектрах в области 600 нм и слабым сверхтонким расщеплением в спектрах ЭПР; Т2 – моноядерный центр, не детектирующийся в УФ и видимой областях спектра поглощения фермента, но имеющий характерный спектр ЭПР; Т3 – биядерный диамагнитный центр, который проявляет себя на спектрах поглощения в области 330 нм в виде достаточно размытого плеча. Центры Т2 и Т3 объединены в трехядерный медный кластер, ответственный за восстановление дикислорода до воды [3]. В зависимости от окислительно-восстановительного потенциала иона меди типа Т1 лакказы принято подразделять на высоко- и низкопотенциальные [4]. Принято считать, что механизм катализа лакказами включает три стадии: 1) восстановление иона меди типа Т1 субстратом-донором электрона; 2) внутримолекулярный перенос электрона ионами меди активного центра; 3) восстановление молекулярного кислорода с

образованием воды трехядерным медным кластером [2].

Лакказы широко распространены в различных грибах [5] и растениях [6]. Лакказоподобные оксидазы обнаружены также в микроорганизмах [7] и в организме животных [2]. Считается, что лакказы растений участвуют в свободно-радикальных реакциях синтеза лигнина, в то время как функции грибных лакказ значительно шире. Они участвуют в морфогенезе грибов, защите их от стресса, а также в деградации лигнина [8]. Возможно, локализация лакказ в клетке и рН среды, при которой функционируют эти ферменты, коррелируют с их физиологической активностью, что в свою очередь определяет набор субстратов для этих ферментов и условия их функционирования. В проявлении субстратной специфичности лакказ особую роль играет редокс-потенциал Т1 – центр ферментов.

Цель настоящей работы – проведение сравнительных исследований биокаталитических реакций, протекающих с участием высоко-редокс-потенциальных грибных лакказ *Trametes hirsuta* и *Cerena maxima* и низко-редокс-потенциальной лакказы из сока лакового дерева *Rhus vernicifera*.

Методы исследования

Условия культивирования организмов и очистка ферментов

Глубинное культивирование штаммов-продуцентов базидиальных грибов *T. hirsuta* и *C. maxima* проводили по методу, описанному в работе [9]. Использовали

следующую последовательность стадий очистки ферментов: осаждение белков из культуральной жидкости сульфатом аммония в диапазоне насыщения 0–90%; ионообменная хроматография низкого давления на носителе “Сервацел ДЭАЭ 52” (“Reanal”, Венгрия); адсорбционная хроматография на носителе “НТР Bio-Gel” (“Bio-Rad”, США); рехроматография на носителе “DEAE-Toyopearl 650M” (“Toyo Soda”, Япония). Заключительный этап очистки всех ферментов – стадия жидкостной хроматографии высокого давления на колонке “BioSep-SEC-S 2000 Phenomenex” (США) с использованием HPLC – системы “Стайер” (“Аквилон”, Россия). Все стадии очистки ферментного препарата проводили при температуре 4°C.

Ферментный препарат из латекса лакового дерева *R. vernicifera* был любезно предоставлен проф. В. Рейнхаммером (Швеция). Он также был дополнительно очищен методом хроматографии высокого давления. Все исследуемые ферментные препараты были гомогенны по данным ДДС-электрофореза.

Определение молекулярной массы. Молекулярную массу лакказ определяли методом ДДС-электрофореза в градиенте ПААГ. В качестве белков-метчиков использовали (кДа): целлюлазу (94,6), БСА (66,2), овальбумин (45,0), карбоангидразу (31,0), ингибитор трипсина (21,5), лизозим (14,4). Концентрацию белка в использованных растворах определяли по методу, описанному в работе [10].

Кинетические исследования. Активность лакказ в реакциях окисления органических и неорганических субстратов определяли спектрофотометрически по скорости образования продукта и электрохимическим методом с использованием кислородного электрода типа Кларка по уменьшению тока восстановления дикислорода, потребляемого в процессе ферментативной реакции при потенциале рабочего электрода –600 мВ. Кинетические параметры реакций окисления субстратов рассчитывали с учетом стехиометрии протекающих реакций.

Ферментативные реакции, катализируемые лакказами, проводили в 40 мМ универсальном буферном растворе при выбранном значении pH.

Биоэлектрокаталитические эксперименты проводили на вольтамперометрическом анализаторе “CV-50W” (“Bioanalytical Systems”, США), используя трехэлектродную электрохимическую ячейку. В качестве рабочего электрода использовали стержень спектрального графита (“Ringsdorff Werke”, Германия). Имобилизацию ферментов на поверхности рабочего электрода осуществляли путем адсорбции 10 мкл того или иного ферментного препарата в течение

30 мин. Неадсорбированный фермент удаляли путем многократной помывки электрода рабочим буферным раствором.

Циклические вольтамперограммы записывали на обновленной поверхности электрода при различных значениях pH рабочего буфера в интервале потенциалов от –200 до 1000 мВ относительно Ag/AgCl (потенциал 210 мВ относительно нормального водородного электрода (отн. НВЭ)) при скорости развертки потенциала 10 мВ/с.

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: борная кислота, АБТС (диаммониевая соль 2,2-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната)) (“Sigma”, США), гидрохинон (“Roth”, Германия), $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (“Alfa Aesar”, Германия), NaOH (“Fluka”, Германия), H_3PO_4 , CH_3COOH , NaF, пирокатехин (отечественные препараты марки “ос.ч.”), серингалдазин (“ICN”, Германия), гваякол (“Acros Organics”, США).

Все растворы, за исключением растворов для ферментации, готовили с использованием деионизированной воды, полученной на установке “Milli Q” (“Millipore”, США).

Результаты и обсуждение

Одним из подходов для понимания физиологической роли грибных и древесных лакказ является выяснение активности этих ферментов по различным субстратам при разных значениях pH раствора как в гомогенных, так и гетерогенных системах. Профили зависимости активности высокопотенциальных ферментов из базидиальных грибов *T. hirsuta* и *S. maxima* от pH раствора, представленные в ряду различных субстратов, весьма близки и отличаются лишь формой для субстратов-доноров только электронов и субстратов-доноров одновременно водорода и электронов.

Как видно из рис. 1, высокопотенциальная грибная лакказа базидиального гриба *T. hirsuta* обладает каталитической активностью при значениях pH раствора до 6,5 по обоим типам субстратов. Для субстратов-доноров электронов (к которым относятся АБТС и $K_4Fe(CN)_6$) активность ферментов при возрастании pH раствора сначала практически не изменяется, а затем монотонно уменьшается. При использовании в качестве субстратов ферментов органических соединений-доноров атомов водорода (например, гидрохинона, серингалдазина) зависимость активности грибных лакказ от pH раствора имеет колоколообразный вид. Различие в pH-зависимости для субстратов лакказ, относящихся к различным типам доноров, можно

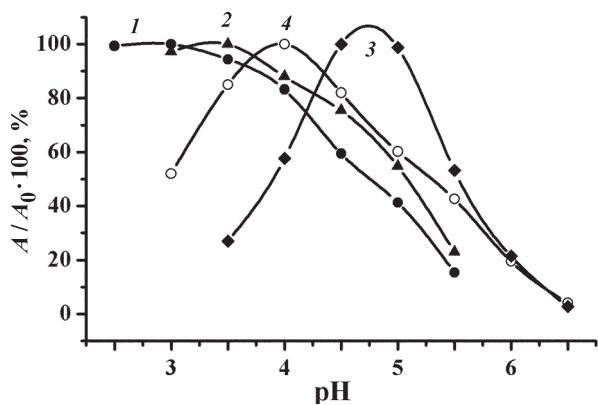


Рис. 1. pH-Зависимость реакций окисления доноров электронов (1 – АБТС, 2 – $K_4Fe(CN)_6$) и доноров атомов водорода (3 – серингалдазин, 4 – гидрохинон) в присутствии лакказы *Trametes hirsuta*. Условия: 0,04 М универсальный буфер; концентрация лакказы $0,8 \cdot 10^{-8}$ М, АБТС – 1 мМ, $K_4Fe(CN)_6$ – 10 мМ, гидрохинона – 10 мМ, серингалдазина – 0,025 мМ

объяснить следующим образом. Для обоих типов субстратов начальная скорость ферментативных реакций при сдвиге pH раствора в сторону щелочных значений уменьшалась за счет ингибирования реакции гидроксил-ионами, которые связываются с трехъядерным T2/T3 кластером лакказ [2]. Для органических субстратов грибных лакказ (доноров атомов водорода), относящихся к фенольным субстратам, потенциал ионизации уменьшается при увеличении pH раствора, и, следовательно, скорость реакции возрастает. Комбинация этих двух процессов объясняет колоколообразную форму кривой pH-зависимости ферментативной реакции для субстратов-доноров атомов водорода. Для АБТС и гексацианоферрата (АА) калия, которые являются донорами электронов, потенциал ионизации субстратов не изменяется

с изменением pH раствора, в результате чего на графике pH-зависимости наблюдается небольшое плато, а затем плавное падение скорости реакции окисления субстратов.

Дополнительным подтверждением описанных выше особенностей грибных лакказ является ингибирование фторид-анионами каталитических реакций окисления обоих типов субстратов (рис. 2, а, б). Фторид-анион подобно гидроксил-аниону связывается с трехъядерным T2/T3 кластером и нарушает внутримолекулярный перенос электронов от субстрата фермента на молекулярный кислород. Ингибирование ферментативных реакций окисления АБТС и гидрохинона 1 мМ NaF составляет 95 и 96%, соответственно.

Иная картина наблюдается при ферментативном окислении субстратов обеих групп в присутствии низкопотенциальной лакказы из лакового дерева *R. vernicifera*. В отличие от высокопотенциальных грибных лакказ *T. hirsuta* и *S. maxima*, низкопотенциальная древесная лакказа способна катализировать окисление органических субстратов-доноров атомов водорода в нейтральных и слабощелочных растворах, оставаясь при этом каталитически неактивной при кислых значениях pH. В то же время данный фермент проявляет каталитическую активность по отношению к субстратам-донорам электронов только в кислой области pH (рис. 3). Это означает, что для субстратов-доноров атомов водорода данный фермент слабо ингибируется гидроксил-анионами. В отличие от высокопотенциальных грибных лакказ, активность низкопотенциальной древесной лакказы слабо ингибируется ионами фтора в нейтральной и щелочной области при использовании субстратов-доноров атомов водорода. Однако подобно высокопотенци-

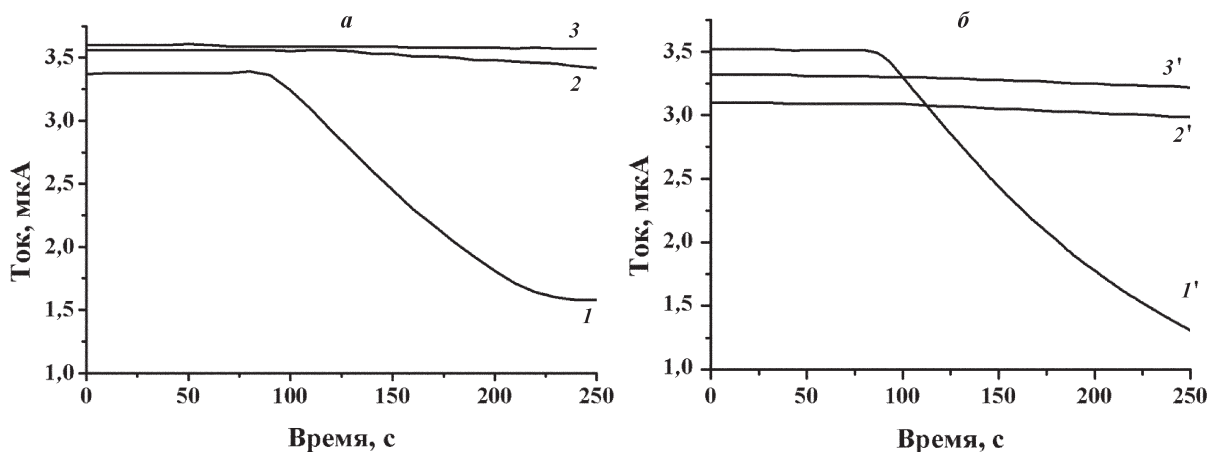


Рис. 2. Ингибирование начальной скорости реакций окисления АБТС (а) и гидрохинона (б), катализируемых лакказой *Cerrena maxima*. 1, 1' – в отсутствии ингибитора; 2, 2' – в присутствии 1 мМ NaF; 3, 3' – фон в отсутствие лакказы. Условия: концентрация лакказы $3,3 \cdot 10^{-8}$ М, 0,04 М универсальный буфер pH 4,0, 1 мМ АБТС, 10 мМ гидрохинон

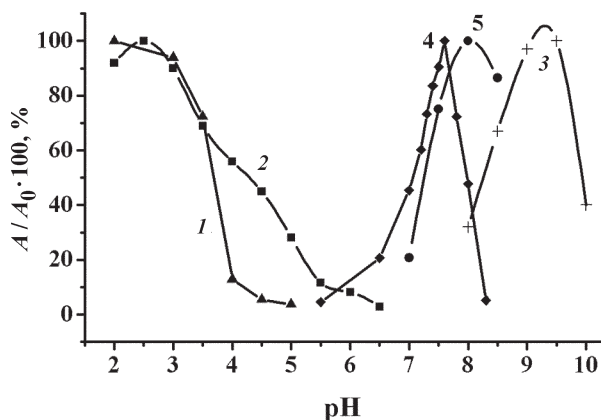


Рис. 3. pH-Зависимость реакций окисления доноров электронов (1 – АБТС, 2 – $K_4Fe(CN)_6$) и доноров атомов водорода (3 – гваякол, 4 – гидрохинон, 5 – пирокатехин) в присутствии лакказы *Rhus vernicifera*. Условия: 0,04 М универсальный буфер. Концентрация лакказы $9,2 \cdot 10^{-8}$ М, АБТС – 1 мМ, пирокатехина – 10 мМ, гидрохинона – 10 мМ, $K_4Fe(CN)_6$ – 10 мМ, гваякола – 10 мМ

альным ферментам из базидиальных грибов, лакказа *R. vernicifera* теряет свою активность в присутствии галогенид-анионов в реакциях окисления субстратов-доноров электрона в кислых значениях pH раствора.

Сравнение pH-зависимостей высокопотенциальных грибных и низкопотенциальной древесной лакказ дает возможность объяснить их физиологическую функцию, в частности их роль в реакциях деградации или синтеза лигнина. Высокопотенциальные лакказы из древоразрушающих грибов, к которым относятся грибы белой гнили *T. hirsuta* и *C. maxima*, имеют редокс-потенциал 780 ± 20 и 750 ± 20 мВ отн. НВЭ [4, 11] соответственно, в то время как лакказа из латекса лакового дерева *R. vernicifera* относится к низкопотенциальным лакказам и имеет редокс-потенциал 440 ± 20 мВ отн. НВЭ [4, 12].

Марганец в микроколичествах присутствует в различных лигноцеллюлозных материалах. Ионы марганца Mn^{3+} являются сильными окислителями и способны непосредственно окислять нефенольные подструктуры лигнина, способствуя деградации последнего. Ранее было показано [13], что ионы Mn^{3+} образуются при ферментативном окислении ионов Mn^{2+} в присутствии хелатирующих агентов (щавелевой, винной и фумаровой кислот). Последние, как было показано в работе [14], необходимы для понижения редокс-потенциала пары Mn^{2+}/Mn^{3+} , тем самым делая возможным окисление Mn^{2+} молекулярным кислородом в присутствии высоко редокс-потенциальных лакказ. Так, потенциал начала реакции окисления комплекса Mn^{2+} -тарtrat в Mn^{3+} -тарtrat составляет приблизительно 950 мВ, что делает термодинамически воз-

можным его окисление дикислородом в присутствии высокопотенциальных лакказ из грибов белой гнили, имеющих значение редокс-потенциала в интервале от 750 до 800 мВ [4, 11–13]. Таким образом, высокопотенциальные лакказы способны непосредственно участвовать в реакциях деградации лигнина не только путем непосредственного окисления фенольных подструктур лигнина, но и опосредованно, в результате окисления нефенольных подструктур ионами трехвалентного марганца, образующимися в процессе ферментативной реакции, катализируемой грибными лакказами. Было показано, что низкопотенциальный фермент из лакового дерева *R. vernicifera*, имеющий редокс-потенциал 440 мВ, не способен катализировать эту реакцию и как следствие не может участвовать в процессах деградации лигнина. Однако в области нейтральных и слабощелочных значений pH лакказа из лакового дерева эффективно катализирует окисление гваякола, гидрохинона и диметоксифенола, которые являются структурными единицами лигнина. Таким образом, в результате протекания свободно-радикальных реакций этот фермент может участвовать в синтезе лигнина из мономеров.

Биоэлектрокаталитические исследования

Исследованные лакказы были иммобилизованы путем физической адсорбции на поверхности графитового электрода, являющегося в данном случае субстратом-донором электронов в реакции электровосстановления дикислорода. Оба фермента катализируют реакцию электровосстановления молекулярного кислорода до воды. Потенциал полуволны реакции электровосстановления молекулярного кислорода близок к редокс-потенциалу ионов меди Т1 типа исследованных высоко- и низкоредокс-потенциальных ферментов (рис. 4).

Подобно гомогенной реакции, катализируемой низкопотенциальной лакказой из лакового дерева, биокаталитическая реакция электровосстановления дикислорода в присутствии этого фермента практически полностью ингибируется фторид-анионами в кислой области pH и слабо в нейтральной (рис. 4, а). При этом активность лакказы *C. maxima* полностью ингибируется фторид-анионами в кислых значениях pH раствора (рис. 4, б). Кроме того, грибные лакказы не проявляют активность в нейтральных и слабощелочных растворах.

Авторы благодарят канд. биол. наук. А.В. Софьина за оказание помощи в процессе очистки ферментных препаратов.

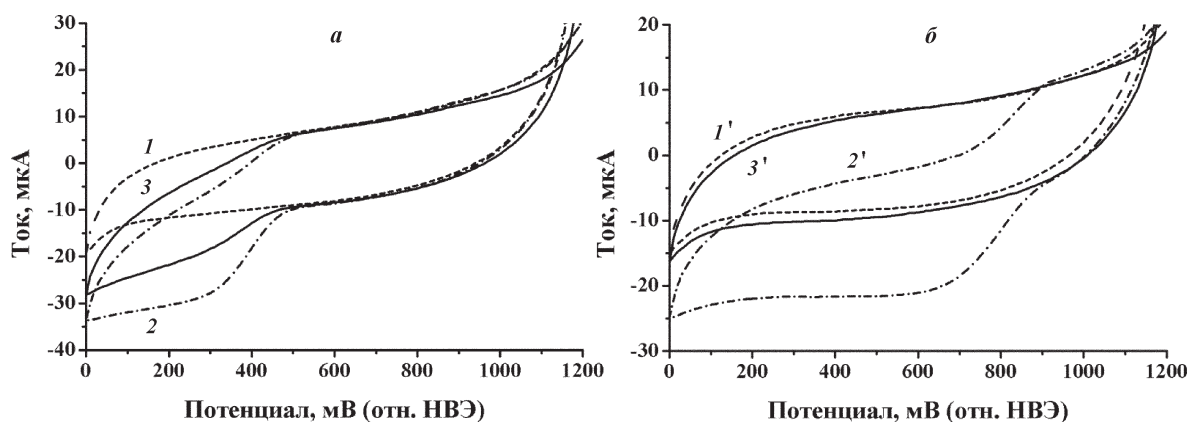


Рис. 4. Циклические вольтамперограммы реакций электровосстановления молекулярного кислорода на графитовых электродах, модифицированных низкопотенциальной лакказой *Rhus vernicifera* (а) и высокопотенциальной грибной лакказой *Cerrena maxima* (б). 1, 1' – фоновая реакция в отсутствие фермента; 2, 2' – в присутствии адсорбированного фермента; 3, 3' – в присутствии фермента и ингибитора. Условия: 0,04 М универсальный буфер рН 7,5 (а) и 4,0 (б)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yaropolov A.I., Skorobogat'ko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeev S.D. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1994. **49**. P. 257.
2. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. // Chem. Rev. 1996. **96**. P. 2563.
3. Lyashenko A.V., Zhukhlistova N.E., Gabdoulkhakov A.G., Zhukova Y.N., Voelter W., Zaitsev V.N., Bento I., Stepanova E.V., Kachalova G.S., Koroleva O.V., Cherkashyn E.A., Tishkov V.I., Lamzin V.S., Schirwitz K., Morgunova E.Y., Betzel C., Lindley P.F., Mikhailov A.M. // Acta Cryst. 2006. **62**. P. 954.
4. Shleev S., Tkac J., Christenson A., Ruzgas T., Yaropolov A.I., Whittaker J.W., Gorton L. // Biosens. Bioelectron. 2005. **20**. P. 2517.
5. Baldrian P. // FEMS Microbiol Rev. 2006. **302**. P. 215.
6. Bao W., O'Malley D.M., Whetten R., Sederoff R.R. // Science 1993. **260**. P. 672.
7. Alexandre G., Zhulin I.B. // Trends Biotechnol. 2000. **18**. P. 41.
8. Leonowicz A., Cho N.-S., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg G., Rogalski J. // J. Basic Microbiol. 2001. **41**. P. 185.
9. Горшина Е.С., Русинова Т.В., Бирюков В.В., Морозова О.В., Шлеев С.В., Ярополов А.И. // Прикл. биохим. микробиол. 2006. **42**. С. 638.
10. Ehresmann B., Imbault P., Well J.H. // Anal. Biochem. 1973. **54**. P. 454.
11. Shleev S. V., Morozova O.V., Nikitina O.V., Gorshina E.S., Rusinova T.V., Serezhenkov V.A., Burbaev D.S., Gazaryan I.G., Yaropolov A.I. // Biochimie. 2004. **86**. P. 693.
12. Reinhammar, B.R.M. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. **275**. P. 245.
13. Hufer C., Schlosser D. // FEBS Lett. 1999. **451**. P. 186.
14. Никитина О.В., Шлеев С.В., Горшина Е.С., Русинова Т.В., Ярополов А.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2005. **46**. С. 267.

Поступила в редакцию 23.11.07

COMPARATIVE STUDIES OF BIOCATALYTIC REACTIONS OF HIGH- AND LOW-REDOX POTENTIAL LACCASES IN HOMOGENEOUS AND HETEROGENEOUS REACTIONS

M.A. Gorbacheva¹, G. P. Shumakovich¹, O.V. Morozova¹, A.V. Streltsov¹, E.A. Zaitseva², S.V. Shleev¹

(A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS)

The comparison of homogeneous catalytic and heterogeneous bioelectrocatalytic properties of high- and low-redox potential fungal and trees laccases has been performed. The significant differences in the catalytic activity of fungal and trees laccases towards electron-donor and proton-electron-donor substrates at different pH, as well as bioelectrocatalytic activity of oxygen reduction by these enzymes, were shown. A suggestion about dependence of different biocatalytic properties of studied enzymes and their possible roles in the metabolism of lignin was given.