

## ОЦЕНКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛАККАЗЫ *TRAMETES VERSICOLOR* КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Бовт Е.А., Кравченко Е.М., Дорошкевич В.С., Одарюк И.Д., Баранова О.В.

ГОУ ВПО Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24. г. Донецк, 283001, ДНР; e-mail: bio-chem@mail.ru

Поступила в печать: 29.06.2018

**Аннотация.** В рамках теории функционала плотности (DFT) с использованием гибридного функционала B3LYP рассчитаны геометрические, электронные и термодинамические характеристики молекул и катион-радикалов замещенных одно-, двух-, трехатомных фенолов. Определены кинетические параметры реакции лакказного окисления многоатомных фенолов, гидроксibenзойных кислот и аскорбиновой кислоты в цитратном буферном растворе pH = 4,6, 308 К. Активность лакказы *Trametes Versicolor* в реакции окисления фенолов сопоставлена с величинами потенциала ионизации изучаемых субстратов.

**Ключевые слова:** лакказа, фенолы, потенциал ионизации, спектрофотометрия, квантово-химические расчеты.

В настоящее время одной из актуальных проблем ферментативного катализа и биотехнологии является изучение каталитических свойств лакказ, выделенных из грибов [1, 2]. Известно, что эти ферменты эффективно разрушают лигнин, извлекая из растительных объектов низкомолекулярные вещества, обладающие в том числе и антиоксидантными свойствами. Лакказа (*n*-дифенол: кислород оксидоредуктаза) относится к группе медьсодержащих оксидаз, катализирующих восстановление молекулярного кислорода до воды. В качестве восстановителей используются различные по природе соединения, которые выступают субстратами лакказы.

Лакказа *Trametes Versicolor*, находит широкое применение в самых разных технологических процессах, благодаря высокой удельной активности и относительно низкой субстратной специфичности [3]. Это значит, что число субстратов, которые фермент может использовать в качестве восстановителей кислорода, может определяться широким кругом органических веществ.

Окисление фенольных соединений лакказой может осуществляться по двум возможным механизмам НАТ (Hydrogen Atom Transfer) и РСЕТ (Proton-Coupled Electron Transfer) [4]. Согласно первому механизму, происходит отрыв атома водорода как одновременный перенос электрона и протона с атомной орбитали (АО) на акцептор [5]. В тоже время возможен отрыв атома Н по второму пути, заключающийся в сопряженном переносе электрона и протона с разных АО замещенного фенола [4].

В зависимости от природы фенольного соединения и среды, в которой происходит окисление, возможна реализация как НАТ, так и РСЕТ механизмов, а также их комбинация. Так как НАТ и РСЕТ механизмы реализуются в одну стадию и приводят к одинаковым конечным продуктам, очень трудно их разделить и предсказать механизм реакции. С усовершенствованием вычислительной техники и разработкой новых неэмпирических методов, стало возможным количественное изучение механизмов сложных многостадийных реакций, в том числе и такого каталитического процесса, как окисление органических соединений фенольной природы молекулярным кислородом в присутствии лакказы *Trametes Versicolor*.

Целью данной работы является сопоставление рассчитанных квантово-химическим методом геометрических, электронных и термодинамических характеристик молекул, катион-радикалов и радикалов замещенных одно-, двух-, трехатомных фенолов с активностью лакказы *Trametes Versicolor*.

В качестве объектов исследования были выбраны одно-, двух- и трехатомные фенолы, а также их производные, представленные в таблице. Кинетику расходования многоатомных фенолов и накопления продуктов их лакказного окисления исследовали спектрофотометрическим методом на приборе SPECORD S300 UV VIS (Германия). Кинетические параметры ферментативного процесса (максимальная скорость реакции ( $V_{max}$ , мкМ·с<sup>-1</sup>), константа Михаэлиса – Ментен ( $K_m$ , мМ), каталитическая константа реакции ( $k_{cat}$ , с<sup>-1</sup>), приведенная константа скорости реакции ( $k_{cat}/K_m \cdot 10^4$ , (М·с)<sup>-1</sup>)) определяли из уравнения Михаэлиса – Ментен:

$$V_0 = \frac{k_{cat} [E]_0 [S]_0}{K_m + [S]_0},$$

где  $V_0$  – начальная скорость, М·с;  $k_{cat}$  – эффективная каталитическая константа скорости процесса, с<sup>-1</sup>;  $K_m$  – константа Михаэлиса, М;  $[E]_0$  – начальная концентрация фермента, М;  $[S]_0$  – начальная концентрация субстрата, М. Для расчета  $k_{cat}$  использовали усредненное значение молекулярной массы лакказы – 67 кДа. Величины эффективных каталитических констант скорости реакции окисления субстратов представлены в таблице.

Методом DFT [6] с использованием гибридного функционала B3LYP/6-311G++ [7, 8] выполнены квантово-химические расчеты энтальпий образования молекул и катион-радикалов замещенных одно-, двух-, трехатомных фенолов. Минимизация геометрии осуществлялась методом квадратичного приближения

(quadratic approximation). Влияние растворителя (вода) учитывалось в рамках модели IEFPCM [9]. Все расчеты проведены в Gamess – US [9, 10], для визуализации использовался пакет Molden. Вычисления проводились в распараллеленном режиме с использованием Linux – кластера, состоящего из 8 рабочих станций.

Известно, что потенциал ионизации является одной из важнейших характеристик молекул, влияющий на их реакционную способность [11]. Потенциал ионизации  $PI_{\text{pHON}}$  (кДж/моль) рассчитывали по формуле (1):

$$PI_{\text{pHON}} = \Delta H_{(\text{pHO}^+\text{H})}^0 - \Delta H_{(\text{pHON})}^0 \quad (1)$$

где  $\Delta H_{(\text{pHO}^+\text{H})}^0$  – стандартная теплота образования феноксильного катион-радикала, кДж/моль;  $\Delta H_{(\text{pHON})}^0$  – стандартная теплота образования молекулы фенола, кДж/моль. В таблице приведены потенциалы ионизации изучаемых соединений и некоторые кинетические параметры.

Значительный интерес представляет изучение взаимосвязи величин потенциалов ионизации и экспериментально полученной каталитической константой скорости  $k_{\text{cat}}$  лакказного окисления ряда исследуемых субстратов фермента (соединения 1-17 табл. 1). На рисунке приведена зависимость эффективной каталитической константы скорости  $k_{\text{cat}}$  лакказы *Trametes Versicolor* от потенциала ионизации  $PI$  производных гидрохинона (1-9).

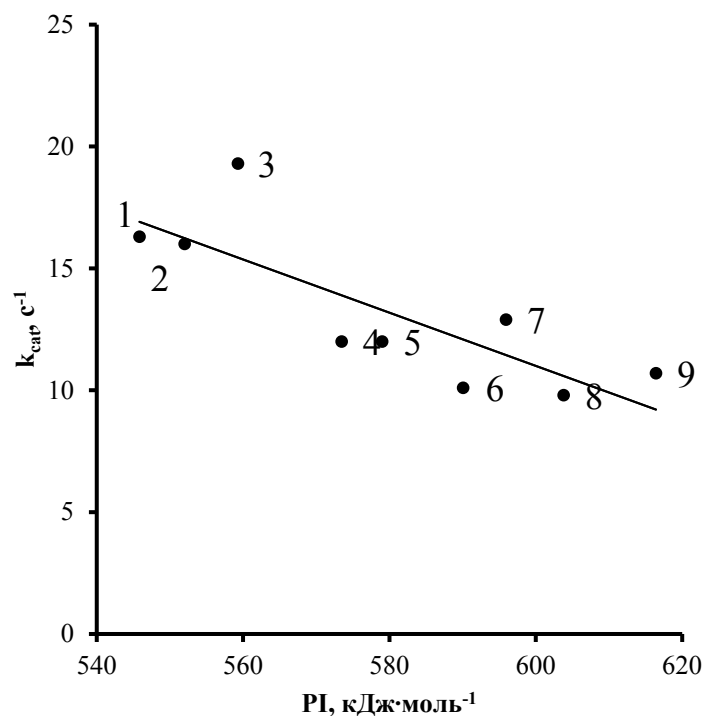
Из рисунка 1 видно, что потенциалы ионизации и каталитические константы скорости в изучаемом ряду соединений связаны обратно пропорциональной корреляционной зависимостью с достаточно высоким значением коэффициента корреляции, равным 0,65. Очевидно, процесс окисления производных гидрохинона проходит по одинаковому механизму.

В тоже время для бензойных кислот, тролокса, флороглюцина, галловой и аскорбиновой кислот удовлетворительной корреляционной зависимости каталитической константы скорости от потенциала ионизации не выявлено. Это, вероятно, связано с тем, что гидроксibenзойные кислоты окисляются по механизму, отличающемуся от механизма окисления производных гидрохинона.

Также в эту корреляционную зависимость не попадают данные для соединений пирокатехинового ряда, что, очевидно, связано с проявлением орто-эффекта. Наличие установленных в данной работе корреляционных зависимостей представляет значительный интерес для изучения влияния молекулярной структуры на скорость реакции ферментативного окисления потенциальных субстратов лакказы.

**Таблица 1.** Расчетные значения потенциалов ионизации  $PI$  (кДж·моль<sup>-1</sup>) и кинетических параметров реакции лакказного окисления

	Соединение	$PI$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	$V_{\text{max}}$ , мкМ·с <sup>-1</sup>	$K_m$ , мМ	$k_{\text{cat}}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{\text{cat}}/K_m \cdot 10^4$ , (М·с) <sup>-1</sup>
1	Триметилгидрохинон	546			16,3	
2	2,3-дицианогидрохинон	631			16,0	
3	Метилгидрохинон	559	0,68	0,053	11,3 19,4	21,3
4	Гидрохинон	573	3,61	0,30	12,0	4,06
5	Третбутилгидрохинон	703			12,0	
6	Бромгидрохинон	590	0,61	0,057	10,1	17,7
7	Хлоргидрохин	596	0,77	0,082	12,9	15,7
8	2,5-дибромгидрохинон	604			9,8	
9	2,5-дихлоргидрохинон	616	1,08	0,21	18	8,6
10	Пирокатехин	593	6,50	0,73	21,7	2,95
11	Флороглюцин	608	0,50	0,17	1,66	0,97
12	Тролокс	530			13,7	
13	п-оксибензойная кислота	654	0,004	0,88	0,013	0,001
14	3,4-дигидроксibenзойная кислота	625	6,98	0,0018	23,4	130
15	2,5-дигидроксibenзойная кислота	598	4,35	0,0071	14,56	205
16	Аскорбиновая кислота	620	0,31	0,082	1,03	1,26
17	Галловая кислота	626	0,25	0,21	0,82	0,39



**Рисунок 1.** Корреляционная зависимость  $k_{cat}$  от потенциала ионизации  $PI$  для производных гидрохинона: 1 – триметилгидрохинон, 2 – 2,3-дицианогидрохинон, 3 – метилгидрохинон, 4 – гидрохинон, 5 – третбутилгидрохинон, 6 – бромгидрохинон, 7 – хлоргидрохинон, 8 – 2,5-дибромгидрохинон, 9 – 2,5-дихлоргидрохинон

#### Список литературы / References:

1. Морозова О.В. [и др.]. Лакказы-медиаторные системы и их использование: обзор. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2007, т. 43, с. 583-597. [Morozova O.V., Lakkaza-mediator systems and their use: a review. *Prikladnaya biochimia i mikrobiologia*, 2007, vol. 43, pp. 583-597. (In Russ.)]
2. Rodríguez-Delgado Gibrán M.M., José S.A.-N., Rodríguez-Delgado M. [et al.] Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, vol. 74, pp. 21-45.
3. Куликова Н.А., Кляйн О.И. [и др.] Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2011, т. 47, с. 619-634. [Kulikova N.A., Klein O.I. [et al.]. Use of basidiomycetes in technologies for processing and utilization of man-caused waste: fundamental and applied aspects. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, vol. 47, pp. 619-634. (In Russ.)]
4. Sirjoosingh A., Hammes-Schiffer S. Sirjoosingh A. Proton-coupled electron transfer versus hydrogen atom transfer: generation of charge-localized diabatic states. *J. Phys. Chem. A*, 2011, vol. 115, pp. 2367-2377, DOI: 10.1021/jp111210c.
5. Hammes-Schiffer S. Proton-coupled electron transfer: Moving together and charging forward. *J. Am Chem. Soc.*, 2015, pp. 8860-8871, DOI: 10.1021/jacs.5b04087.
6. Burke K., Werschnik J., Gross E.K.U. Time-dependent density functional theory: Past, present, and future. *J. Chem. Phys.*, 2005, vol. 123, pp. 2206-2218.
7. Becke A.D. Densityfunctional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, 1993, vol. 98, pp. 5648-5652.
8. Lee C., Yang W., Parr R. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 1998, vol. 37, pp. 785-789.
9. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.*, 2005, vol. 105(8), pp. 2999-3094.
10. Young D. *Computational Chemistry*. Wiley-Interscience, 2001, 334 p.
11. Schmidt M.W. General Atomic and Molecular Electronic Structure System. *J. Comput. Chem.*, 1993, vol. 14, pp. 1347-1363, DOI:10.1002/jcc.540141112.

**EVALUATION OF ENZYMATIC ACTIVITY OF LACCASE FROM *TRAMETES VERSICOLOR*  
BY QUANTUM-CHEMICAL METHODS**

**Bovt E.A., Kravchenko E.M., Doroshkevich V.S., Odaryuk I.D., Baranova O.V.**

State Educational Institution of Higher Professional Education Donetsk National University

*Universitetskaya str., 24. Donetsk, 283001; e-mail: bio-chem@mail.ru*

**Abstract.** Geometric, electronic and thermochemical characteristics of molecules and cation-radicals of substituted mono-, di-, triatomic phenols have been calculated within the framework of the density functional theory (DFT) using the B3LYP hybrid functional. The kinetic parameters of the laccase oxidation reaction of polyatomic phenols and ascorbic acid in citrate buffer pH = 4,6, 308 K. The activity of laccase from *Trametes Versicolor* in the oxidation reaction of phenols is compared with the values of the ionization potential of the studied substrates.

**Key words:** *laccase, phenols, ionization potential, spectrophotometry, quantum-chemical calculations.*