

НОВАЯ ДВУХДОМЕННАЯ ЛАККАЗА СО СРЕДНИМ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА

© 2023 Л.И. Трубицина^{1*}, И.В. Трубицин¹, А.В. Лисов¹, А.Г. Габдулхаков²,
А.Г. Заварзина³, О.В. Белова¹, А.П. Ларионова¹, С.В. Тищенко², А.А. Леонтьевский¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
142290 Пушино, Московская обл., Россия; электронная почта: lyubov_yurevich@mail.ru

² Институт белка РАН, 142290 Пушино, Московская обл., Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения,
119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.05.2023

После доработки 04.09.2023

Принята к публикации 08.09.2023

Ген ранее неисследованной двухдоменной лакказы был идентифицирован в геноме актинобактерии *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ac-1300. Двухдоменная лакказа, названная ScaSL, была продуцирована в гетерологичной системе экспрессии (штамм *Escherichia coli* M15 [pREP4]). Фермент был очищен до гомогенного состояния с использованием аффинной хроматографии. Лакказа ScaSL, как и большинство двухдоменных лакказ, проявляла активность в форме гомотримера. Однако, в отличие от большинства двухдоменных лакказ, она была активна и в мультимерных формах. Фермент проявлял максимальную активность при 80 °С и был термостабилен. Время полуинактивации ScaSL при 80 °С составило 40 мин. Лакказа окисляла нефенольное органическое соединение 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин сульфонат) (АБТС) с максимальной скоростью при рН 4,7, окисляла фенольное соединение 2,6-диметоксифенол с максимальной скоростью при рН 7,5. Стабильность лакказы наблюдалась в диапазоне рН 9–11. При рН 7,5 лакказа слабо ингибировалась азидом натрия, фторидом натрия и хлоридом натрия; при рН 4,5 лакказа полностью ингибировалась 100 мМ азидом натрия. Значения K_m и k_{cat} фермента для АБТС составили 0,1 мМ и 20 с⁻¹, а для 2,6-диметоксифенола – 0,84 мМ и 0,36 с⁻¹ соответственно. ScaSL катализировала полимеризацию гуминовых кислот и лигнина. Окислительно-восстановительный потенциал лакказы составил 0,472 ± 0,007 В. Таким образом, лакказа ScaSL – первая охарактеризованная двухдоменная лакказа со средним окислительно-восстановительным потенциалом. Кристаллическая структура ScaSL была определена с разрешением 2,35 Å. Сравнительный анализ структур ScaSL и других двухдоменных лакказ позволил предположить, что средний потенциал ScaSL может быть связан с конформационными различиями в положениях боковых групп аминокислот в позиции 230 (в нумерации ScaSL), относящихся ко второй координационной сфере атома меди T1-центра.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: двухдоменная лакказа, *Streptomyces carpinensis*, клонирование, кристаллизация, термостабильность, окислительно-восстановительный потенциал.

DOI: 10.31857/S0320972523100184, **EDN:** OYBJZH

ВВЕДЕНИЕ

Лакказы – медьсодержащие оксидазы, которые катализируют восстановление кислорода до воды, при этом окисляют широкий спектр органических и неорганических соединений [1]. Лакказы широко распространены у растений, грибов и бактерий [2], обнаружены у на-

секомых [3], лишайников [4], водорослей [5]. В структурном отношении лакказы можно подразделить на двухдоменные (2д) и трёхдоменные (3д) ферменты [6]. 2д-Лакказы обнаружены только у бактерий.

Лакказы выполняют различные функции у живых организмов: участвуют в синтезе вторичных метаболитов, споруляции, патогенезе [7].

Принятые сокращения: 2д – двухдоменная(ые); 3д – трёхдоменная(ые); 2,6-ДМФ – 2,6-диметоксифенол; АБТС – 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин сульфонат); ОВП – окислительно-восстановительный потенциал.

* Адресат для корреспонденции.

Бактерии используют лакказы для трансформации полимерных соединений, таких как лигнин или гуминовые вещества (органические вещества, содержащиеся в почвенных и водных экосистемах) [8, 9, 10]. Грибные 3д-лакказы окисляют гуминовые вещества и лигнин, что приводит к их полимеризации или деполимеризации [8, 11]. Бактериальные 2д-лакказы также способны трансформировать лигнин и гуминовые вещества, но эти субстраты только полимеризуются под действием 2д-лакказ [12, 13]. Бактериальные 2д-лакказы – термостабильные ферменты, которые способны выдерживать инкубирование при 70 °С, 80 °С и даже при 90 °С [14]. В отличие от 3д-лакказ грибов, которые стабильны при кислых или нейтральных значениях pH [15, 16], бактериальные 2д-лакказы стабильны при нейтральных или щелочных значениях pH [17, 18]. К тому же 2д-лакказы окисляют фенольные соединения при нейтральных или щелочных значениях pH [18, 19, 20], тогда как 3д-лакказы окисляют фенольные соединения преимущественно в кислой среде [21]. Ещё одно важное различие между 2д- и 3д-лакказами – устойчивость 2д-лакказ к действию классических ингибиторов 3д-лакказ. При кислых значениях pH азиды и фториды в низких концентрациях способны практически полностью ингибировать активность 3д-лакказ [22, 23], тогда как 2д-лакказы проявляют активность даже при 10 мМ концентрации данных ингибиторов [19]. Более того, при щелочных значениях pH эти ингибиторы не влияют на активность 2д-лакказ или могут незначительно повышать активность ферментов [20, 24].

Известно, что 3д-лакказы грибов используются в биотехнологических процессах [25]: ферменты применяют для биоремедиации сточных вод текстильных заводов, для отбеливания бумажной массы [7, 26], для химического синтеза [27], в пищевой промышленности [28], для создания биосенсоров [29]. Такое широкое применение 3д-лакказ возможно благодаря их низкой субстратной специфичности [30] и высокому окислительно-восстановительному потенциалу (ОВП) [31]. Известно, что лакказа способна окислять соединения, ОВП которых равен или чуть выше ОВП T1-центра фермента. Исходя из этого, более высокий ОВП позволяет применять фермент в биотехнологических процессах. Установлено, что все 2д-лакказы, описанные к настоящему времени – низкопотенциальные ферменты [32]. Величина ОВП 2д-лакказ составляет 0,33–0,45 В. Поэтому, несмотря на тот факт, что 2д-лакказы имеют определённый

биотехнологический потенциал (они термостабильны, окисляют фенольные соединения в нейтральной или щелочной среде, стабильны в широком диапазоне величин pH, устойчивы к действию классических ингибиторов лакказ), они активно не используются в промышленности из-за низкого ОВП. Исходя из этого, поиск новых 2д-лакказ со средним или высоким ОВП является актуальной задачей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование гена 2д-лакказы. Штамм *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ас-1300 (также известный как =DSM 43835) был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (<http://www.vkm.ru/>). Штамм культивировали при 29 °С (pH 7,2) в среде следующего состава (г/л): крахмал – 20,0; K₂HPO₄ – 0,5; KNO₃ – 1; NaCl – 0,2; MgSO₄ × 7 H₂O – 0,3; CaCO₃ – 0,5; FeSO₄ × 7 H₂O – 0,01; агар – 20. Полученную биомассу использовали для выделения геномной ДНК. Выделение геномной ДНК проводили с использованием коммерческого набора («diaGene», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Полноразмерную последовательность гена идентифицировали и анализировали с помощью онлайн-сервиса Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ген без последовательности сигнального пептида амплифицировали с использованием геномной ДНК в качестве матрицы, прямого и обратного праймеров (1300F3nS – ACCTCGGACAAGCCCG, 1300R3/2 – TCACATGCCGGGCATG) и Taq-ДНК-полимеразы («Сиб-Энзим», Россия). Программа амплификации была следующей: 1) начальная денатурация: 95 °С, 5 мин; 2) 35 циклов: денатурация – 95 °С, 30 с; отжиг – 50 °С, 30 с; элонгация – 72 °С, 1 мин; 3) финальная элонгация: 72 °С, 2 мин. Продукт ПЦР требуемой величины очищали из реакционной смеси с использованием коммерческого набора («diaGene») в соответствии с инструкцией производителя. Последовательность гена подтверждали секвенированием. Для клонирования гена в вектор pQE-30 («Qiagen», Германия) по сайтам эндонуклеаз рестрикции *SacI* и *HindIII* использовали следующие праймеры: 1300Fe3nS – AGTGAGCTCACCTCGGACAAGCCCG и 1300Re3 – TCA AAGCTTTTCACATGCCGGGCATG (сайты *SacI* и *HindIII* выделены подчёркиванием). Условия амплификации были следующими: 95 °С, 5 мин; 35 циклов: 95 °С, 30 с, 50 °С, 30 с, 72 °С, 1 мин; 72 °С, 2 мин. Ампликон обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *SacI* и *HindIII*

(«Thermo Fisher Scientific», США) согласно инструкции производителя. Затем ставили реакцию лигирования вектора и ампликона при +15 °С с использованием T4-ДНК-лигазы («Thermo Fisher Scientific»). Лигазной смесью, содержащей конструкцию pQE::scaSl, трансформировали компетентные клетки *E. coli* M15 [pREP4] («QiaGen»). Плазмиды с геном-вставкой получали из ночной культуры трансформантов. Последовательность гена-вставки проверяли на отсутствие мутаций секвенированием.

Экспрессия и очистка ScaSL. Для получения рекомбинантного белка ScaSL 1 мл «ночной культуры» трансформантов инокулировали в 200 мл среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и канамицин (25 мкг/мл). Клетки выращивали при 37 °С и 150 об./мин до оптической плотности 1,0 при 600 нм, затем вносили индуктор – 0,2 мМ ИПТГ, а также 1 мМ CuSO₄. После 15 ч роста температуру снижали до 20 °С и выращивали культуру без перемешивания 24 ч. Клетки осаждали центрифугированием при комнатной температуре (7000 об./мин, 30 мин). Осадок ресуспендировали в буфере 1 (500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0) и разрушали ультразвуком. Клеточный экстракт, полученный после центрифугирования (10 000 об./мин, 40 мин), наносили на колонку HisTrapTMFF («GE Healthcare», США) с Ni-сефарозой. Колонку уравнивали с буфером 1, промывали пятью объемами буфера 2 (500 мМ NaCl, 50 мМ имидазол, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0) для удаления белков, неспецифично связанных с носителем, и элюировали лакказу буфером 3 (500 мМ NaCl, 300 мМ имидазол, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0). Фракции, содержащие синий ферментный препарат, диализовали против 20 мМ Tris-HCl (pH 9,0). Фермент хранили при +8 °С. Концентрацию белка определяли с использованием коэффициента молярной экстинкции, рассчитанного на основе последовательности белка в программе Vector NTI («Life Technologies», США). Полученное значение коэффициента для ScaSL: $\epsilon_{280} = 38\,930 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Молекулярную массу мономерной формы фермента определяли при помощи денатурирующего электрофореза в 12%-ном ПААГ [33]. Молекулярную массу активной формы фермента определяли при помощи нативного градиентного электрофореза, как описано ранее [14]. Визуализацию активности фермента проводили согласно методике, описанной ранее [14].

Характеристика ScaSL. Активность лакказы измеряли при комнатной температуре

по скорости окисления 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин сульфоната) (АБТС) при 420 нм ($\epsilon_{420} = 36\,000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) [34] и 2,6-диметоксифенола (2,6-ДМФ) при 469 нм ($\epsilon_{469} = 49\,600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) [35] в 50 мМ буфере Britton–Robinson [36]. Спектр поглощения измеряли в диапазоне длин волн от 700 до 300 нм на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония). Оптимумы pH измеряли с АБТС и 2,6-ДМФ в 50 мМ буфере Britton–Robinson (диапазон величин pH: 3,0–5,5 для АБТС, 5,5–9,0 для 2,6-ДМФ). Температурный оптимум измеряли в температурном диапазоне 30–80 °С в 50 мМ буфере Britton–Robinson с 0,2 мМ АБТС при pH 4,5. Стабильность фермента измеряли при pH 3, 5, 7, 9, 11 в аналогичных условиях в течение недели. Термостабильность ScaSL определяли, измеряя остаточную активность фермента после часа инкубирования при 70 °С, 80 °С и 90 °С в аналогичных условиях. Влияние азидата натрия (NaN₃), хлорида натрия (NaCl) и фторида натрия (NaF) в концентрациях 1, 10 и 100 мМ на лакказную активность определяли при pH 4,7 по скорости окисления 0,2 мМ АБТС, при pH 7,5 – по скорости окисления 1 мМ 2,6-ДМФ. Кинетические константы определяли для субстратов АБТС и 2,6-ДМФ при pH 4,7 и pH 7,5 соответственно, при 30 °С. Расчёт констант проводили в программе Sigma Plot 11.0. ОВП лакказы ScaSL измеряли методом редокс-титрования с использованием редокс-пары K₃[Fe(CN)₆] / K₄[Fe(CN)₆] ($E'^{\circ} = 0,433 \text{ В}$) в атмосфере азота [14, 37]. ОВП T1-центра рассчитывали согласно уравнению Нернста в программе Origin Pro 2015 («Origin-Lab Corporation», США). Средние значения и стандартные отклонения рассчитывали не менее чем для трёх повторностей.

Реакция 2д-лакказы с полимерными субстратами. Для эксперимента использовали гуминовую кислоту из торфа («Merck», Германия), натриевую соль лигносульфонокислоты («Sigma-Aldrich», США). Гуминовую кислоту из дерново-подзолистой почвы (Stagnic Retisol, Loamic, Humic, согласно мировой реферативной базе почвенных ресурсов, WRB 2015) с зольностью 3% получали в атмосфере N₂, как описано ранее [38]. Реакцию 2д-лакказы с полимерными веществами в щелочной среде и анализ продуктов реакции методом гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-75 проводили, как описано ранее [13].

Кристаллизация. Кристаллизацию осуществляли при 24 °С с использованием метода диффузии паров в модификации «висящая капля» на силиконизированных стёклах в планшетах Linbro («Molecular Dimensions»,

Великобритания). Кристаллизационные капли готовили путём смешивания 3 мкл белка с концентрацией 14 мг/мл и 1 мкл раствора, содержащего 20% (v/v) смеси ПЭГ (PEG Smear Broad), 0,1 М цитрата натрия, pH 5,6, 0,15 М ацетата магния (условие № 33 набора VCS-1, «Molecular Dimensions»). Перед замораживанием кристаллы вымачивали в криорастворе, состоящем из 20% ПЭГ 4000, 20% глицерина, 0,1 М ацетата натрия, pH 4,6, 0,16 М сульфата аммония (условия № 20 набора Crystal Screen Cryo, «Hampton Research», США).

Сбор и обработка данных. Сбор дифракционных данных проводили посредством лабораторного источника рентгеновского излучения, состоящего из генератора с вращающимся анодом Proteum X8, оснащённого оптикой Montel 200 («Bruker», США) и детектором PLATINUM 135 («Bruker»), в Институте белка РАН. Данные обрабатывали и усредняли с помощью программы PROTEUM2 (<http://www.bruker.ru>).

Решение и уточнение кристаллической структуры. Пространственную структуру лакказы определили методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser [39]. В качестве стартовой модели использовали структуру 2д-лакказы *Streptomyces lividans*, определённую с разрешением 2,4 Å (PDB ID 4GYB). Структуру ScaSL уточняли с помощью программы Phenix.refine [40]. Ручную правку структуры проводили в программе Coot [41]. Качество уточнения оценивали с помощью сервера MolProbity [42]. Атомные координаты модели и структурные факторы лакказы депонировали в банке данных белков PDB, ID 8AIP. Рис. 5 и 6 подготовили с использованием программы PyMOL Molecular Graphics System v2.5 (<https://pymol.org/2/>) [43].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клонирование лакказного гена, его экспрессия и очистка ScaSL. Ген, кодирующий 2д-лакказу ScaSL, был клонирован из штамма *S. carpinensis* ВКМ Ас-1300 в плазмиду pQE-30. Анализ аминокислотной последовательности ScaSL показал наличие сигнального пептида для транслокации лакказы по ТАТ-секреторному пути (1–37 а.о.). В последовательности также присутствовали консервативные аминокислоты: десять гистидинов и один цистеин, координирующие четыре атома меди.

Клетки *E. coli*, несущие рекомбинантный вектор, продуцировали ScaSL с высоким выходом: около 100 мг с 1 л культуры. Очистку про-

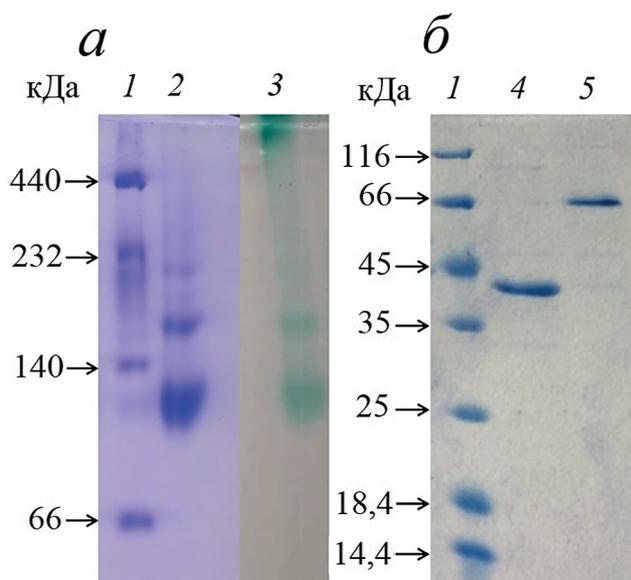


Рис. 1. Нативный градиентный (3–15%) электрофорез в ПААГ (а) и ДСН-ПААГ-электрофорез (б) лакказы ScaSL из *S. carpinensis* ВКМ Ас-1300. 1 – Маркеры молекулярной массы; 2 – окрашивание белка с Coomassie Brilliant Blue R-250; 3 – зимограмма лакказной активности с АБТС; 4 – фермент после очистки, кипячённый с β-меркаптоэтанолом и ДСН; 5 – фермент после очистки с β-меркаптоэтанолом и ДСН, без кипячения

водили в одну стадию при помощи аффинной хроматографии. Чистый белковый препарат имел тёмно-синий цвет. Нативный электрофорез в ПААГ показал, что белковая полоса соответствовала молекулярной массе 100 кДа (белок был активен в гомотримерной форме (рис. 1, а)).

Однако на электрофорезе детектировались другие полосы активного белка. Это свидетельствовало о том, что белок олигомеризовался с образованием активных комплексов. Рекомбинантный ScaSL, кипячённый с β-меркаптоэтанолом, имел молекулярную массу 37 кДа, согласно данным электрофореза в ПААГ с ДС-Na; фермент с β-меркаптоэтанолом без кипячения имел молекулярную массу 68 кДа (рис. 1, б). Это указывало на значительное количество водородных связей, участвующих во взаимодействии отдельных субъединиц фермента.

Характеристика лакказы ScaSL. Лакказа ScaSL окисляла типичные субстраты лакказ: 2,6-ДМФ и АБТС. Максимальная активность лакказы в отношении АБТС наблюдалась при pH 4,7; в отношении 2,6-ДМФ – при pH 7,5 (рис. 2, а). Температурный оптимум фермента составлял 80 °С (рис. 2, б). Остаточная активность лакказы после часа инкубирования при 70 °С, 80 °С и 90 °С составляла 62%, 40% и 33% соответственно (рис. 2, в). Фермент сохранял 60% и 52% своей исходной активности после

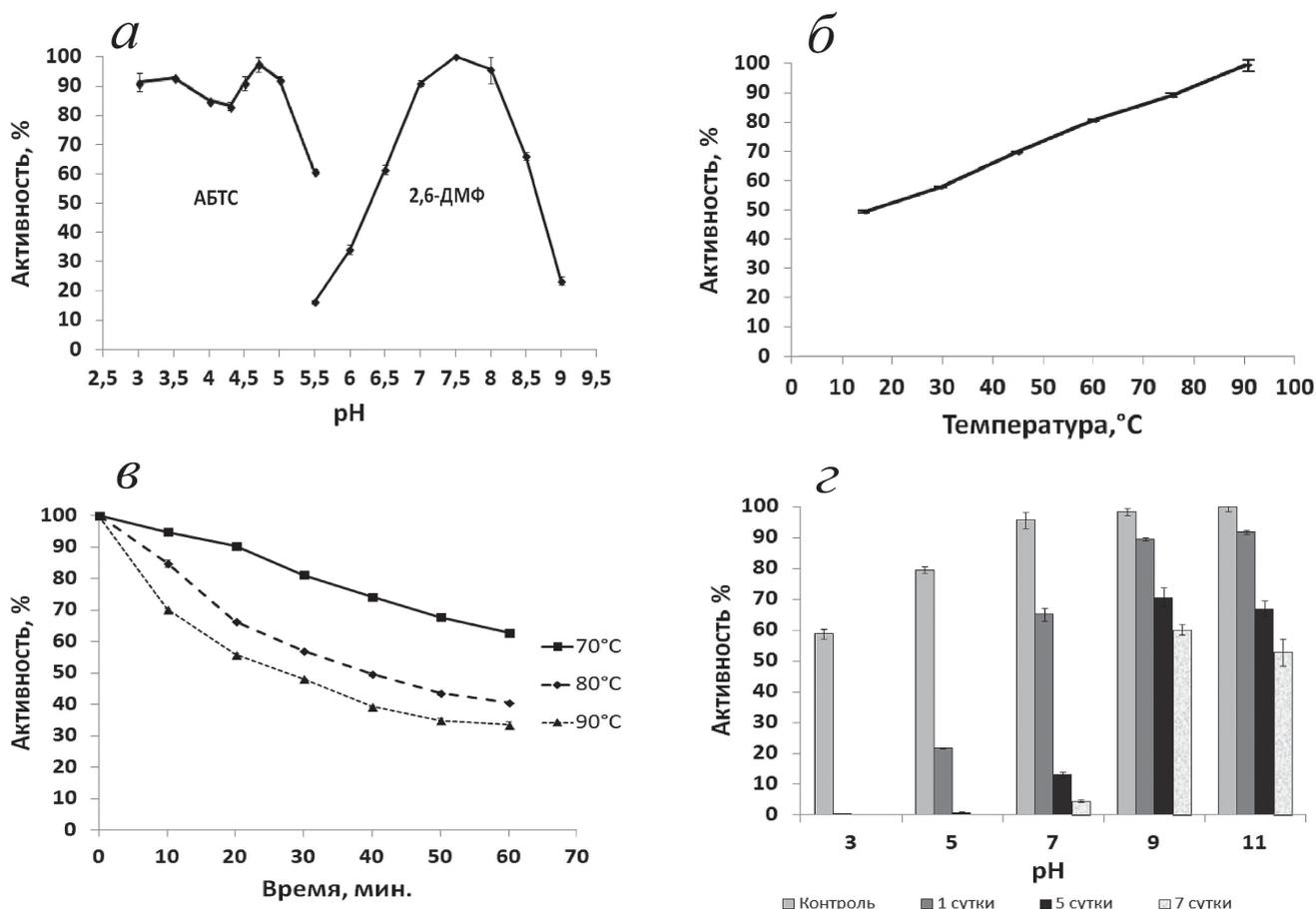


Рис. 2. Биохимические свойства ScaSL. Оптимумы pH фермента по АБТС и 2,6-ДМФ (а); температурный оптимум активности лакказы (б); термостабильность при 70, 80 и 90 °С (в); стабильность при различных pH (г)

одной недели инкубации при значениях pH 9 и pH 11 соответственно (рис. 2, г). При инкубации лакказы при pH 3,0 фермент полностью инактивировался в течение 24 ч.

Спектр поглощения лакказы имел пик при 590 нм и плечо около 330–340 нм из-за присутствия Т1-медного центра и Т3-медного центра соответственно (рис. 3, а). Окислительно-восстановительный потенциал Т1-центра ScaSL составил $0,472 \pm 0,007$ В (рис. 3, б).

Кинетические константы ScaSL определяли в отношении субстратов АБТС и 2,6-ДМФ. Для АБТС K_m составила 0,1 мМ, k_{cat} составил 20 с^{-1} . Для 2,6-ДМФ K_m составила 0,84 мМ, k_{cat} составил $0,36 \text{ с}^{-1}$. Исследовано влияние некоторых ингибиторов лакказы (NaN_3 , NaF, NaCl и ЭДТА) на активность фермента (табл. 1).

Влияние ингибиторов измеряли в кислых (pH 4,7) и щелочных (pH 7,5) условиях. NaN_3 , NaF и NaCl не оказывали сильного ингибирующего эффекта на активность лакказы при pH 7,5: при 100 мМ NaN_3 , NaCl и NaF остаточная активность ScaSL составляла 78%, 95% и 95% соответственно. ЭДТА оказывала сильное ингибирующее действие на ScaSL: остаточная

Таблица 1. Влияние ингибиторов на активность лакказы

Ингибитор	Концентрация, мМ	Остаточная активность, %	
		pH 4,7	pH 7,5
NaN_3	1	50,2	102,3
	10	10,3	110,2
	100	0	78
NaF	1	92,3	100
	10	58,3	100,8
	100	16,6	95,3
NaCl	1	95,2	99,4
	10	74,6	100
	100	36,5	95
ЭДТА	1	105,7	99,2
	10	92,7	63,8
	100	78,1	8,7

Примечание. Стандартные отклонения рассчитаны не менее чем для трёх повторностей.

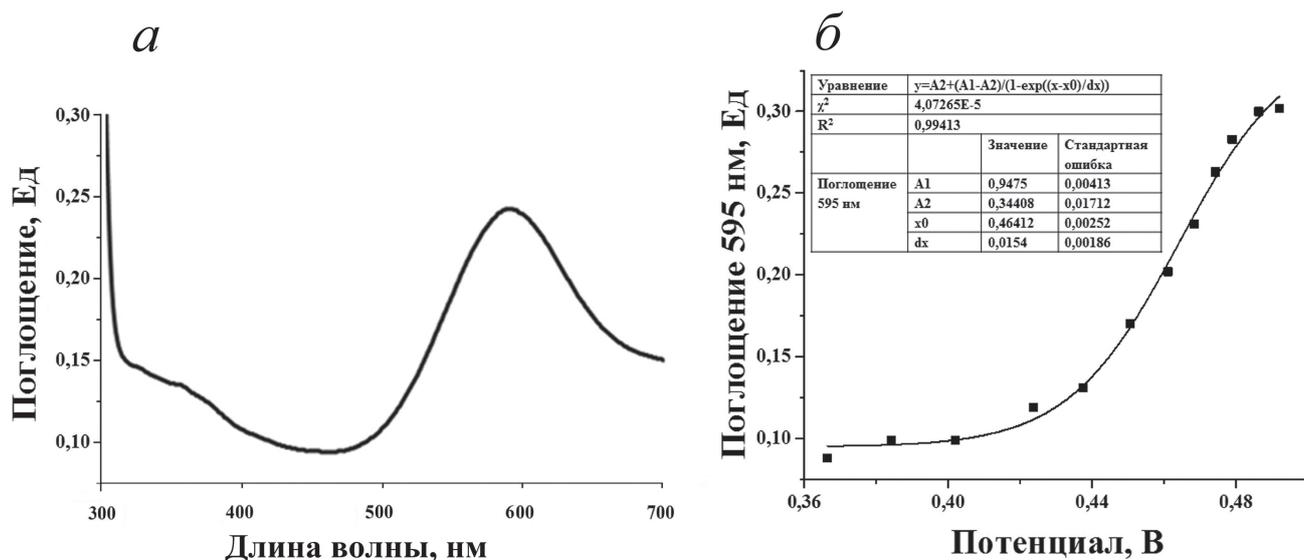


Рис. 3. Спектр поглощения ScaSL (а) и кривая редокс-титрования T1-центра ScaSL (б)

активность фермента в присутствии 100 мМ ЭДТА составляла 8%. При pH 4,7 лакказы сильно ингибировалась 10 мМ NaN_3 , сохраняя примерно 10% от начальной активности; однако фермент сохранял 74% от начальной активности в присутствии 100 мМ NaCl и 58% от начальной активности в присутствии 100 мМ NaF. ЭДТА при pH 7,5 не оказывала сильного ингибирующего действия на активность лакказы.

Гуминовые кислоты. Фермент катализировал окисление гуминовых кислот и лигносульфонокислоты. Гуминовые кислоты как из дерново-подзолистой почвы, так и из торфа, а также лигносульфонокислота полимеризовались под действием лакказы, о чём свидетельствовало увеличение количества фракции, элюируемой в пустой объём колонки (рис. 4).

Также наблюдалось увеличение количества фракции массой 30–70 кДа в случае гуминовой кислоты из торфа и лигносульфонокислоты.

Снижение количества низкомолекулярной фракции, элюируемой в полный объём колонки, уменьшалось для гуминовых кислот.

Кристаллическая структура ScaSL. Кристаллическая структура ScaSL была определена с разрешением 2,35 Å. Кристаллы относились к пространственной группе P23 и содержали одну молекулу мономера в асимметричной части элементарной ячейки. Статистика сбора и уточнения дифракционных данных представлена в табл. 2.

Общая структура функционального тримера ScaSL напоминала структуры других 2д-лакказ (рис. 5), координация ионов меди также была типична для 2д-лакказ. Ион меди T1-центра располагался вблизи поверхности лакказы, тринуклеарный центр находился на стыках мономеров. Ион меди T2 отсутствовал, что достаточно часто встречается в лакказах. В асимметричной части ячейки находился один мономер.

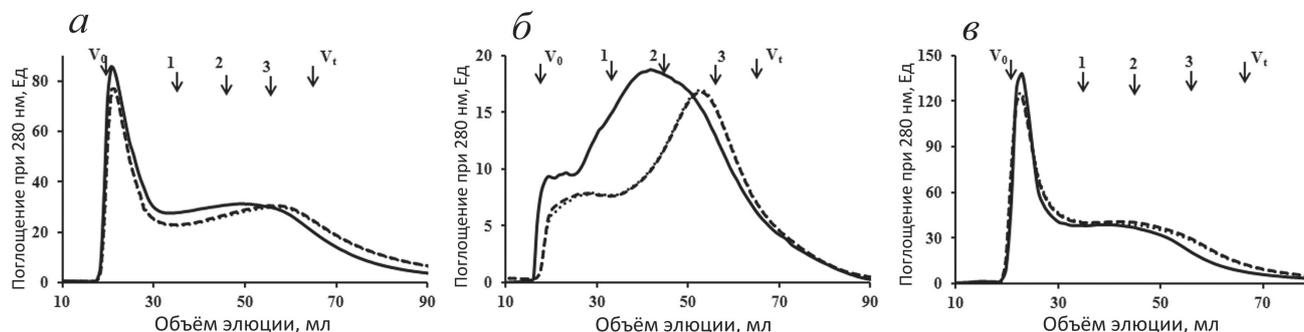


Рис. 4. Реакция ScaSL с гуминовыми кислотами и лигносульфонокислотой: данные гель-фильтрации. Гуминовая кислота из торфа (а); натриевая соль лигносульфонокислоты (б); гуминовая кислота из дерново-подзолистой почвы (в). Сплошная линия – образец после взаимодействия с ScaSL, штриховая линия – исходный образец, пунктирная линия – образец с инактивированной ScaSL. Стрелки указывают на свободный объём колонки ($V_0 > 80$ кДа) и общий объём колонки ($V_i < 5$ кДа); 1 – элюция БСА (66 кДа), 2 – элюция карбоангидразы (29 кДа), 3 – элюция цитохрома с (12,4 кДа)

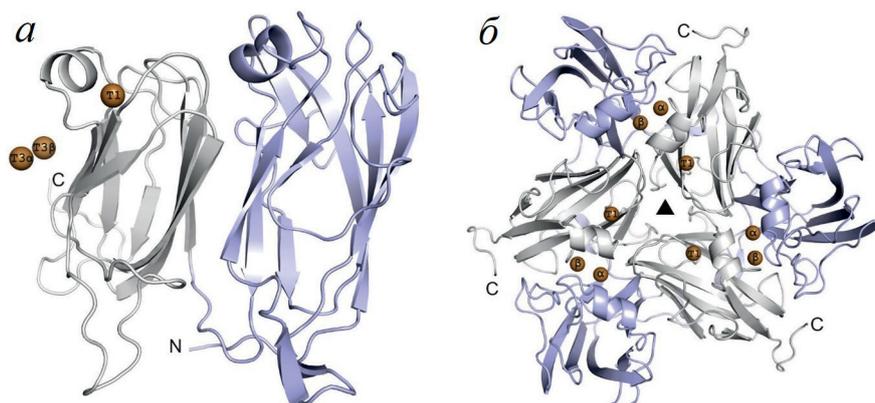


Рис. 5. Структура мономера и функционального тримера ScaSL. *a* – Мономер ScaSL, первый домен показан сиреневым, второй домен серым цветом. Ионы меди показаны оранжевыми сферами. *б* – Функциональный тример, полученный с использованием оси третьего порядка

Таблица 2. Статистические характеристики дифракционного набора и кристаллографического уточнения

Статистика набора	
Пространственная группа	P23
$a = b = c$, (Å)	97,96
$\alpha = \beta = \gamma$, (°)	90,00
Пределы разрешения, Å	32,65–2,3 (2,4–2,3)
R_{sigma} , %	11,1 (64,2)
Среднее $I/\sigma(I)$	6,54 (1,56)
Полнота набора, %	97,0 (83,4)
Избыточность	4,29 (2,13)
Число уникальных отражений	13 826 (1409)
Статистика уточнения	
Разрешение, Å	32,65–2,35 (2,53–2,35)
Общее количество отражений	13 065 (2341)
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$, %	23,1/28,1 (27,5/36,4)
Усреднённый В-фактор, Å ²	30,3
На карте Рамачандрана	
Наиболее предпочтительные районы, %	95,6
Дополнительно разрешённые районы, %	4,4
Среднеквадратичное отклонение	
Длины связей, Å	0,009
Валентные углы, °	0,957

Примечание. Данные в скобках соответствуют интервалу наиболее высокого разрешения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В геноме бактерии *S. carpinensis* ВКМ Ас-1300 был идентифицирован ген ранее неизученной 2д-лакказы. Последовательность гена, кодирующую каталитическую часть белка (без последовательности сигнального пептида), успешно клонировали в вектор рQE-30. Выбор пал на этот вектор, так как ранее проводилось успешное клонирование и экспрессия в указанном векторе пяти других бактериальных 2д-лакказ. Известны случаи агрегации 2д-лакказ при гетерологичной продукции [44], однако рекомбинантная лакказа ScaSL была идентифицирована во фракции супернатанта. Эффект агрегации был минимальным при продукции фермента при 37 °С и отсутствовал при продукции при 20 °С. Культивирование индуцированных клеток в микроаэробных условиях в присутствии ионов меди было необходимо для получения фермента, максимально насыщенного ионами меди [45].

Лакказа ScaSL, как и большинство 2д-лакказ, проявляла активность в форме гомотримера, однако также она могла олигомеризоваться с образованием мультимерных форм. Эффект олигомеризации ранее наблюдался у 2д-лакказы SaSL из *Streptomyces anulatus* [44] и у 2д-лакказы CjSL из *Catenuloplanes japonicus* [20]. Молекулярная масса мономерной формы ScaSL составила 37 кДа. Другие известные 2д-лакказы в форме мономера имели схожие молекулярные массы (33–39 кДа). Физико-химические свойства полученной лакказы были типичны для представителей этого семейства: лакказа была термостабильна, окисляла нефенольное соединение АБТС в кислой среде (рН 4,7), а фенольное соединение 2,6-ДМФ – в нейтральной среде (рН 7,5). Как и большинство бактериальных 2д-лакказ, фермент ScaSL был более

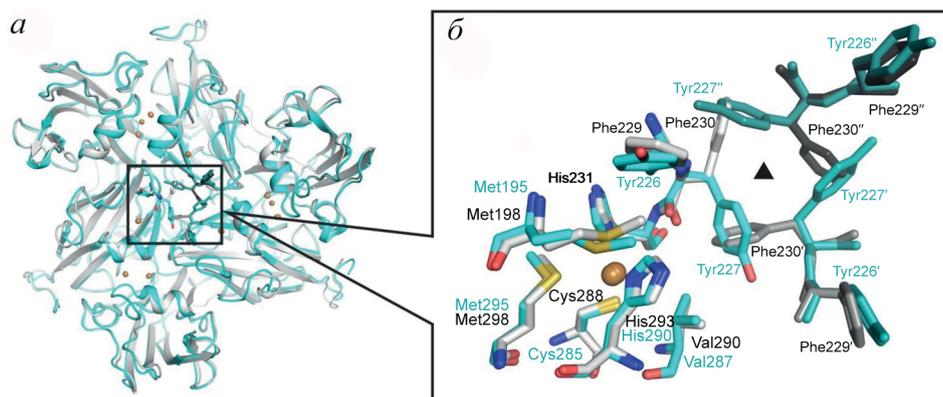


Рис. 6. Структура лакказы ScaSL и SLAC из *S. sviveus*. *a* – Наложение структур ScaSL (серый) и SLAC *S. sviveus* (Ssl1) (голубой). *б* – Увеличение областей вблизи Т1-центра и оси третьего порядка тримера. Ион меди Т1 показан оранжевой сферой, треугольником показана ось 3-го порядка. Остатки тирозина Tyr226 и Tyr227, принадлежащие трём разным мономерам, помечены соответствующим образом (например, Tyr227, Tyr227' и Tyr227'')

стабилен в щелочной среде [13, 17, 18, 44]. Исследуемая лакказа характеризовалась самыми низкими значениями K_m у 2д-лакказ для АБТС и 2,6-ДМФ, они составляли 0,10 мМ и 0,84 мМ соответственно. Так, ранее наименьшая K_m по АБТС была обнаружена у 2д-лакказы SaSL из *S. anulatus* и составила 0,17 мМ [44]; наименьшая K_m для субстрата 2,6-ДМФ была показана для 2д-лакказы Ssl1 из *Streptomyces sviveus* и составила 0,89 мМ [17].

Лакказы принято классифицировать по величине ОВП на ферменты с низким (< 460 мВ), средним (> 460 мВ и < 710 мВ) и высоким (> 710 мВ) потенциалом [31]. Известно, что 2д-лакказы являются низкопотенциальными ферментами. Так, значение ОВП Т1-центра лакказы SLAC из *Streptomyces coelicolor* составило 0,43 В [46], лакказы SvSL из *Streptomyces viridochromogenes* – 0,35 В [14], лакказы Ssl1 из *S. sviveus* – 0,37 В [32], лакказы SilA из *Streptomyces ipomoea* – 0,33 В [47]. Величина ОВП определяет окислительную активность 2д-лакказ [48]. С учётом повышенной окислительной активности лакказы был измерен ОВП фермента. Он составил $0,472 \pm 0,008$ В. Таким образом, полученная 2д-лакказа являлась первым изученным ферментом со средним ОВП.

Как и ранее описанные 2д-лакказы, ScaSL катализировала полимеризацию гуминовых кислот [13]. Лигнин также мог полимеризоваться под действием 2д-лакказ [12]. Грибная 3д-лакказа способна как деполимеризовать лигнин и гуминовые кислоты, так и полимеризовать их [11, 49, 50]. Возможно, полимеризующая способность ScaSL связана с её ОВП: хотя он выше, чем у других 2д-лакказ, но ниже, чем у 3д-лакказ. Таким образом, ОВП белка ещё недостаточен для деполимеризации используемых веществ.

Несмотря на то что аминокислотное окружение активных центров 2д-лакказ в основном практически идентично, некоторые различия всё же наблюдаются, в частности, вблизи Т1-центра. В области Т1-центра происходит связывание и окисление субстрата; в 2д-лакказах он расположен на стыке трёх мономеров (рис. 6).

При наложении участков вблизи Т1-центра ScaSL и Ssl1 видны конформационные различия в расположении двух аминокислотных остатков, принадлежащих второй координационной сфере иона меди CuI (рис. 6). В ScaSL в положениях 229 и 230 находятся фенилаланиновые остатки, тогда как в Ssl1 в соответствующих положениях находятся Tyr226 и Tyr227 (рис. 6). В результате таких замен может измениться не только геометрия субстрат-связывающего кармана, но также гидрофобность и заряд этого участка. Известно, что замены аминокислотных остатков второй координационной сферы иона меди CuI могут существенно влиять на изменение геометрии субстрат-связывающего кармана и, соответственно, на активность 2д-лакказ [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лакказа ScaSL из штамма *S. carpinensis* ВКМ Ас-1300 – новая исследованная двухдоменная лакказа. Фермент был продуцирован в штамме *E. coli* и очищен до гомогенного состояния. Проведено исследование физико-химических свойств фермента. Было установлено, что лакказа является первой изученной двухдоменной лакказой со средним окислительно-восстановительным потенциалом. ScaSL эффективно полимеризовала гуминовые кис-

лоты и лигносульфонокислоту. В дальнейшем планируется изучить способность лакказы разлагать красители различной природы, а также выявить детерминанты, определяющие повышенный окислительно-восстановительный потенциал лакказы ScaSL.

Вклад авторов. Л.И. Трубицина – планирование и проведение экспериментов, обсуждение результатов, написание и редактирование текста; И.В. Трубицин – проведение экспериментов и написание текста; А.В. Лисов – планирование экспериментов, обсуждение результатов и написание текста; А.Г. Габдулхаков – проведение экспериментов и редак-

тирование текста; А.Г. Заварзина – проведение экспериментов; О.В. Белова – проведение экспериментов; А.П. Ларионова – проведение экспериментов; С.В. Тищенко – проведение экспериментов и написание текста; А.А. Леонтьевский – руководство работой.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (проект № МК-5025.2021.1.4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baldrian, P. (2006) Fungal laccases – occurrence and properties, *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**, 215-242, doi: 10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x.
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., et al., (2020) Laccase properties, physiological functions, and evolution, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 996, doi: 10.3390/ijms21030966.
- Asada, N., Namba, M., Kodama, T., and Kyogoku, Y. (2004) Circular dichroism of prophenol oxidase in relation to the structural stability in *Drosophila melanogaster*, *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **56**, 1-6, doi: 10.1002/arch.10137.
- Lisov, A. V., Zavarzina, A. G., Zavarzin, A. A., and Leontievsky, A. A. (2007) Laccases produced by lichens of the order Peltigerales, *FEMS Microbiol. Lett.*, **275**, 46-52, doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00858.x.
- Otto, B., Beuchel, C., Liers, C., Reisser, W., Harms, H., and Schlosser, D. (2015) Laccase-like enzyme activities from chlorophycean green algae with potential for bioconversion of phenolic pollutants, *FEMS Microbiol. Lett.*, **362**, fnv072, doi: 10.1093/femsle/fnv072.
- Nakamura, K., and Go, N. (2005) Function and molecular evolution of multicopper blue proteins, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 2050-2066, doi: 10.1007/s00018-004-5076-x.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., et al. (2019) Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation, *Microb. Cell. Fact.*, **18**, 200, doi: 10.1186/s12934-019-1248-0.
- Munk, L., Sitarz, A. K., Kalyani, D. C., Mikkelsen, J. D., and Meyer, A. S. (2015) Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnol. Adv.*, **33**, 13-24, doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.008.
- Perna, V., Meyer, A. S., Holck, J., Eltis, L. D., Eijsink, V. G. H., and Agger, J. W. (2020) Laccase-catalyzed oxidation of lignin induces production of H₂O₂, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **8**, 831-841, doi: 10.1021/acssuschemeng.9b04912.
- Zahmatkesh, M., Spanjers, H., Toran, M. J., Blánquez, P., and van Lier, J. B. (2016) Bioremoval of humic acid from water by white rot fungi: exploring the removal mechanisms, *AMB Express*, **6**, 118, doi: 10.1186/s13568-016-0293-x.
- Zavarzina, A. G., Leontievsky, A. A., Golovleva, L. A., and Trofimov, S. Ya. (2004) Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an in vitro study, *Soil Biol. Biochem.*, **36**, 359-369, doi: 10.1016/j.soilbio.2003.10.010.
- Majumdar, S., Lukk, T., Solbiati, J. O., Bauer, S., Nair, S. K., et al. (2014) Roles of small laccases from *Streptomyces* in lignin degradation, *Biochemistry*, **53**, 4047-4058, doi: 10.1021/bi500285t.
- Trubitsina, L. I., Lisov, A. V., Belova, O. V., Trubitsin, I. V., Demin, V. V., Konstantinov, A. I., Zavarzina, A. G., and Leontievsky, A. A. (2020) Transformation of low molecular compounds and soil humic acid by two domain laccase of *Streptomyces puniceus* in the presence of ferulic and caffeic acids, *PLoS One*, **15**, e0239005, doi: 10.1371/journal.pone.0239005.
- Trubitsina, L. I., Tishchenko, S. V., Gabdulkhakov, A. G., Lisov, A. V., Zakharova, M. V., and Leontievsky, A. A. (2015) Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*, *Biochimie*, **112**, 151-159, doi: 10.1016/j.biochi.2015.03.005.
- Góralczyk-Bińkowska, A., Jasińska, A., Długoński, A., Płociński, P., and Długoński, J. (2020) Laccase activity of the ascomycete fungus *Nectriella pironii* and innovative strategies for its production on leaf litter of an urban park, *PLoS One*, **15**, e0231453, doi: 10.1371/journal.pone.0231453.

16. Sun, Y., Liu, Z. L., Hu, B. Y., Chen, Q. J., Yang, A. Z., et al. (2021) Purification and characterization of a thermo- and pH-stable laccase from the litter-decomposing fungus *Gymnopus luxurians* and laccase mediator systems for dye decolorization, *Front Microbiol.*, **12**, 672620, doi: 10.3389/fmicb.2021.672620.
17. Gunne, M., and Urlacher, V. B. (2012) Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* with unusual properties discovered by genome mining, *PLoS One*, **7**, e52360, doi: 10.1371/journal.pone.0052360.
18. Feng, H., Zhang, D., Sun, Y., Zhi, Y., Mao, L., et al. (2015) Expression and characterization of a recombinant laccase with alkalistable and thermostable properties from *Streptomyces griseorubens* JSD-1, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **176**, 547-562, doi: 10.1007/s12010-015-1594-2.
19. Molina-Guijarro, J. M., Perez, J., Muñoz-Dorado, J., Guillen, F., Moya, R., et al. (2009) Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*, *Int. Microbiol.*, **12**, 13-21, doi: 10.2436/20.1501.01.77.
20. Trubitsina, L. I., Abdullatypov, A. V., Larionova, A. P., Trubitsin, I. V., Alferov, S. V., Ponamoreva, O. N., and Leontievsky, A. A. (2021) Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes, *PeerJ*, **9**, e11646, doi: 10.7717/peerj.11646.
21. Kaneko, S., Cheng, M., Murai, H., Takenaka, S., Murakami, S., et al. (2009) Purification and characterization of an extracellular laccase from *Phlebia radiata* strain BP-11-2 that decolorizes fungal melanin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 939-942, doi: 10.1271/bbb.80740.
22. More, S. S., Renuka, P. S., Pruthvi, K., Swetha, M., Malini, S. S., et al. (2011) Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp., *Enzyme Res.*, **2011**, 248735, doi: 10.4061/2011/248735.
23. Patel, H., Gupte, S., Gahlout, M., and Gupte, A. (2014) Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1, *3 Biotech*, **4**, 77-84, doi: 10.1007/s13205-013-0129-1.
24. Kolyadenko, I., Scherbakova, A., Kovalev, K., Gabdulkhakov, A., and Tishchenko, S. (2021) Engineering the catalytic properties of two-domain laccase from *Streptomyces griseoflavus* Ac-993, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 65, doi: 10.3390/ijms23010065.
25. Couto, S. R., and Herrera, J. L. T. (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review, *Biotechnol. Adv.*, **24**, 500-513, doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003.
26. Upadhyay, P., Shrivastava, R., and Agrawal, P. K. (2016) Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase, *3 Biotech*, **6**, 15, doi: 10.1007/s13205-015-0316-3.
27. Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., et al. (2008) Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis, *Microb. Cell Fact.*, **7**, 32, doi: 10.1186/1475-2859-7-32.
28. Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., and Rodríguez-Couto, S. (2010) Uses of laccases in the food industry, *Enzyme Res.*, **2010**, 1-8, doi: 10.4061/2010/918761.
29. Coelho, J. H., Eisele, A. P. P., Valezi, C. F., Mattos, G. J., Schirmann, J. G., et al. (2019) Exploring the exocellular fungal biopolymer botryospheran for laccase-biosensor architecture and application to determine dopamine and spironolactone, *Talanta*, **204**, 475-483, doi: 10.1016/j.talanta.2019.06.033.
30. Wang, F., Xu, L., Zhao, L., Ding, Z., Ma, H., et al. (2019) Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: a review, *Microorganisms*, **7**, 665, doi: 10.3390/microorganisms7120665.
31. Mot, A. C., and Silaghi-Dumitrescu, R. (2012) Laccases: complex architectures for one electron oxidations, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1395-1407, doi: 10.1134/S0006297912120085.
32. Gunne, M., Hoppner, A., Hagedoorn, P. L., and Urlacher, V. B. (2014) Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus*, *FEBS J.*, **281**, 4307-4318, doi: 10.1111/febs.12755.
33. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
34. Heinfling, A., Martinez, A. T., Martinez, M. J., Bergbauer, M., and Szewczyk, U. (1998) Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **165**, 43-50, doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13125.x.
35. Wariishi, H., Valli, K., and Gold, M. H. (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators, *J. Biol. Chem.*, **267**, 23688-23695, doi: 10.1016/S0021-9258(18)35893-9.
36. Britton, H. T. K., and Robinson, R. A. (1931) Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal, *J. Chem. Soc.*, **10**, 1456-1462, doi: 10.1039/jr9310001456.
37. Olbrich, A. C., Schild, J. N., and Urlacher, V. B. (2019) Correlation between the T1 copper reduction potential and catalytic activity of a small laccase, *J. Inorg. Biochem.*, **201**, 110843, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110843.
38. Zavarzina, A. G., Kravchenko, E. G., Konstantinov, A. I., Perminova, I. V., Chukov, S. N., and Demin, V. V.

- (2019) Comparison of the properties of humic acids extracted from soils by alkali in the presence and absence of oxygen, *Eur. Soil Sci.*, **52**, 880-891, doi: 10.1134/S1064229319080167.
39. McCoy, J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., et al. (2007) Phaser crystallographic software Airlie, *J. Appl. Crystallogr.*, **40**, 658-674, doi: 10.1107/S0021889807021206.
 40. Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., et al. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with *phenix.refine*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **68**, 352-367, doi: 10.1107/S0907444912001308.
 41. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of *Coot*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 486-501, doi: 10.1107/S0907444910007493.
 42. Chen, V. B., Wedell, J. R., Wenger, R. K., Ulrich, E. L., Markley, J. L. (2015) MolProbity for the masses of data, *J. Biomol. NMR*, **63**, 77-83, doi: 10.1007/s10858-015-9969-9.
 43. DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, Delano Scientific, San Carlos.
 44. Lisov, A. V., Trubitsina, L. I., Lisova, Z. A., Trubitsin, I. V., Zavarzina, A. G., and Leontievsky, A. A. (2019) Transformation of humic acids by two-domain laccase from *Streptomyces anulatus*, *Process Biochemistry*, **76**, 128-135, doi: 10.1016/j.procbio.2018.11.001.
 45. Duraõ, P., Chen, Z., Fernandes, A. T., Hildebrandt, P., Murgida, D. H., et al. (2008) Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**, 183-193, doi: 10.1007/s00775-007-0312-0.
 46. Gallaway, J., Wheeldon, I., Rincon, R., Atanassov, P., Banta, S., Calabrese, S., et al. (2008) Oxygen-reducing enzyme cathodes produced from SLAC, a small laccase from *Streptomyces coelicolor*, *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 1229-1235, doi: 10.1016/j.bios.2007.11.004.
 47. Blázquez, A., Rodríguez, J., Brissos, V., Mendes, S., Martins, L. O., et al. (2019) Decolorization and detoxification of textile dyes using a versatile *Streptomyces* laccase-natural mediator system, *Saudi J. Biol. Sci.*, **26**, 913-920, doi: 10.1016/j.sjbs.2018.05.020.
 48. Xu, F. (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition, *Biochemistry*, **35**, 7608-7614, doi: 10.1021/bi952971a.
 49. Kumar, V. P., Sridhar, M., and Rao, R. G. (2022) Biological depolymerization of lignin using laccase harvested from the autochthonous fungus *Schizophyllum commune* employing various production methods and its efficacy in augmenting in vitro digestibility in ruminants, *Sci. Rep.*, **12**, 11170, doi: 10.1038/s41598-022-15211-9.
 50. Agustin, M. B., de Carvalho, D. M., Lahtinen, M. H., Hilden, K., Lundell, T., et al. (2021) Laccase as a tool in building advanced lignin-based materials, *ChemSusChem*, **14**, 4615-4635, doi: 10.1002/cssc.202101169.

A NOVEL TWO-DOMAIN LACCASE WITH A MIDDLE REDOX POTENTIAL: PHYSICOCHEMICAL AND STRUCTURAL PROPERTIES

**L. I. Trubitsina^{1*}, I. V. Trubitsin¹, A. V. Lisov¹, A. G. Gabdulkhakov², A. G. Zavarzina³,
O. V. Belova¹, A. P. Larionova¹, S. V. Tishchenko², and A. A. Leontievsky¹**

¹ Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow region, Russia; e-mail: lyubov_yurevich@mail.ru

² Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow region, Russia

³ Faculty of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

The gene for a previously unexplored two-domain laccase was identified in the genome of the actinobacterium *Streptomyces carpinensis* VKM Ac-1300. A two-domain laccase, named ScaSL, was produced in a heterologous expression system (*Escherichia coli* strain M15 [pREP4]). The enzyme was purified to homogeneity using affinity chromatography. ScaSL laccase, like most two-domain laccases, exhibited activity in the homotrimer form. However, unlike most two-domain laccases, it was also active in multimeric forms. The enzyme exhibited maximum activity at 80°C and was thermally stable. The half-inactivation time of ScaSL at 80°C was 40 min. Laccase oxidized the non-phenolic organic compound ABTS at a maximum rate at pH 4.7; oxidized the phenolic compound 2,6-dimethoxyphenol at a maximum rate at pH 7.5. Laccase stability was observed in the pH range 9-11. At pH 7.5, laccase was weakly inhibited by sodium azide, sodium fluoride, and sodium chloride; at pH 4.5, laccase was completely inhibited by 100 mM sodium azide.

K_m and k_{cat} of the enzyme for ABTS are 0.1 mM and 20 s⁻¹, respectively. K_m and k_{cat} for 2,6-dimethoxyphenol are 0.84 mM and 0.36 s⁻¹, respectively. ScaSL catalyzed the polymerization of humic acids and lignin. The redox potential of laccase was 0.472 ± 0.007 V. Thus, ScaSL laccase is the first characterized two-domain laccase with a middle redox potential. The crystal structure of ScaSL was determined with a resolution of 2.35 Å. A comparative analysis of the structures of ScaSL and other two-domain laccases suggested that the middle potential of ScaSL may be associated with conformational differences in the position of the side groups of amino acids at position 230 (in ScaSL numbering), which belong to the second coordination sphere of the copper atom of the T1 center.

Keywords: two-domain laccase, *Streptomyces carpinensis*, gene cloning, crystal structure, thermal stability, redox potential