

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ БАЗИДИОМИЦЕТА *Phellinus robustus* K

О. М. Осока, Р. В. Михайлова, О. В. Чихаева

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь, enzyme@mbio.bas-net.by

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) катализируют окисление широкого спектра органических соединений фенольной и ароматической природы и некоторых неорганических ионов до окисленного продукта и H_2O , используя H_2O_2 в качестве акцептора электронов. Пероксидаза является компонентом универсальной системы защиты клетки про- и эукариот. Фермент применяется в химической, пищевой, фармацевтической промышленности, в медицине, научных исследованиях и природоохранных технологиях.

В настоящее время интенсивно исследуются мицелиальные грибы, как перспективные источники пероксидазы. В результате многолетнего поиска продуцентов фермента удалось выделить и охарактеризовать экзопероксидазы около 20 видов грибов: *Arthromyces ramosus* [12, 14], *Cerrena maxima* [4], *Coprinus cinereus* [7], *C. friesii* [7], *C. macrorhizus* [4], *Coriolus hirsutus* [13], *Geotrichum* sp. [1], *Inonotus hispidus* [10], *Inonotus radiatus* [9, 10], *I. weirii* [4, 11], *Nematoloma sublateralinum* [11], *Panus tigrinus* [3], *Phanerochaete chrysosporium* [4], *Phellinus igniarius* [4, 5, 8, 10], *Ph. pini* [10], *Ph. robustus* [10], *Pleurotus ostreatus* [2], *Polystictus tomentosus* [10], *Pyricularia filamentosa* [4].

Цель нашей работы - исследование физико-химических свойств пероксидазы *Ph. robustus* K. Гриб выращивали в условиях стационарного культивирования на среде [9] при 26°C в течение 10 сут. Ультрафильтрационное концентрирование культуральной жидкости проводили на мембранах ПАН с номинальным молекулярно-массовым пределом задержания 20 кДа. Активность пероксидазы определяли по методу [6], принимая за единицу активности такое количество фермента, которое катализирует реакцию превращения 1 мМ пирогаллола с максимальной скоростью за 1 сек. При исследовании свойств пероксидазы проверили: влияние активной кислотности в диапазоне pH 2,0-12,0 и температуры в интервале 5-90°C на активность фермента, pH- и термостабильность - по остаточной активности ферментных растворов после 60 мин выдержки при 25°C в универсальном буфере, pH 2,0-12,0, и 60 мин прогревания при 5-80°C в универсальном буфере, pH 7,0.

В результате исследований установлено, что pH-оптимум действия пероксидазы *Ph. robustus* K находится в диапазоне значений 5,0-7,0 (рис. 1Б). Анализ литературных данных показал, что pH-оптимум действия экзопероксидаз ксилотрофных базидиомицетов и сапротрофных аскомицетов находится в диапазоне значений 3,0-6,0 [1, 2, 4, 5, 8-11, 13]. Однако пероксидазы копрофильных базидиомицетов проявляют максимальную активность при pH 6,0-10,0 [4, 7, 12, 14]. Исключением является пероксидаза *P. tigrinus*, которая не только имеет нейтральный pH-оптимум действия, но и отличается по субстратной специфичности от других экзопероксидаз грибов [3].

Температурный оптимум действия пероксидазы *Ph. robustus* K находится в пределах 40-60°C (рис. 1А), что несколько выше, по сравнению с аналогичным показателем для большинства грибных пероксидаз (30-45°C) [1, 2, 4, 5, 8, 11, 12, 14]. Следует отметить, что описаны пероксидазы грибов как с более низкими, так и с более высокими оптимальными значениями температур для действия фермента: максимальную скорость катализа пероксидазы *Ph. igniarius* и *P. tigrinus* проявляют при 25°C, пероксидаза *C. hirsutus* - при 60-65°C [3, 10, 13].

Пероксидазы грибов не являются термостабильными ферментами, частичная инактивация ферментов происходит при температуре выше 40-50°C [1, 2, 4, 5, 7-12, 14].

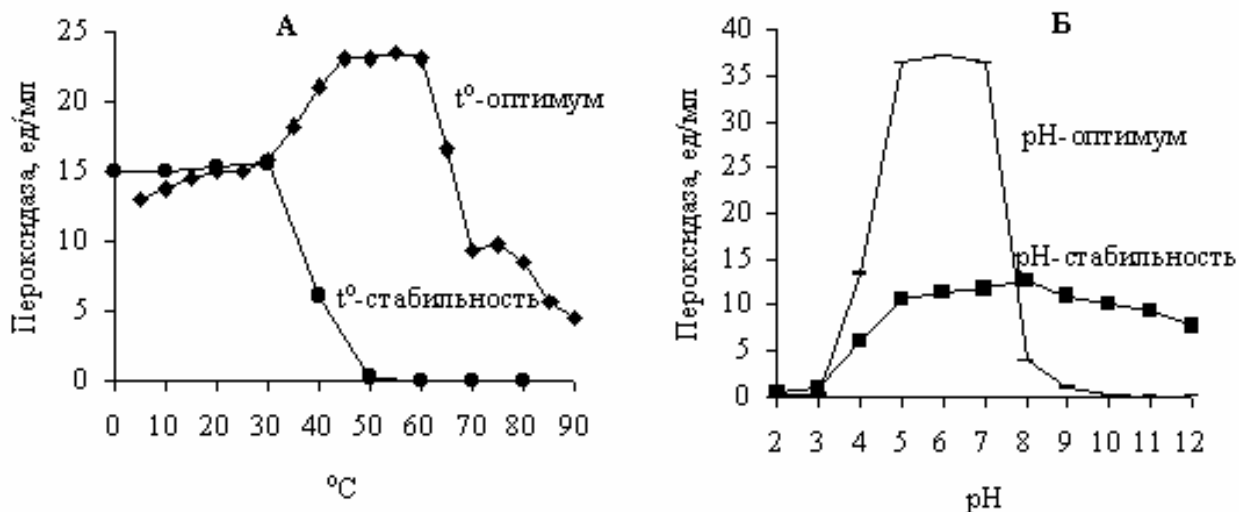


Рис. 1. Влияние температуры (А) и рН (Б) на активность и стабильность пероксидазы *Phellinus robustus* К

Это характерно также и для пероксидазы *Ph.robustus* К. Фермент стабилен при $\leq 40^\circ\text{C}$, однако, инкубация пероксидазы при 50- и 60°C , приводит к потере 60- и 98% ферментативной активности, соответственно (рис. 1А). Наиболее устойчива к воздействию повышенной температуры пероксидаза *C.hirsutus*: инкубирование при 60°C в течение 5 ч не приводит к потере активности [13].

Несмотря на то, что все описанные пероксидазы грибов представлены кислыми белками, профиль рН-стабильности ферментов сдвинут в сторону значений рН 3,0-6,0 [5, 11] только у пероксидаз, продуцируемых ксилотрофными базидиомицетами. Пероксидаза *A.ramosus* стабильна при рН 5,0-9,0, что, вероятно, связано с экологией гриба [12, 14]. Ферментный препарат *Ph.robustus* К также стабилен в этом диапазоне значений рН (рис. 1Б). При рН 2,0-3,0 потери ферментативной активности составляют 95-97%, в то время как при крайних щелочных значениях рН 11,0-12,0 фермент более стабилен, уровень инактивации фермента гриба достигает только 40-50%.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что по основным физико-химическим свойствам пероксидаза *Ph.robustus* К по близка к описанным пероксидазам грибов. Фермент отличается повышенной стабильностью в щелочной области рН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова В.М., Двойнос Л.М. // Микробиол. журнал. - 1971. - 33 (3). - С. 321-323.
2. Кузьмина Л.А. // Автореф. дисс. к.б.н. - Ташкент, 2004. - 22 с.
3. Ревин В.В., Кадималиев Д.А., Атыкян Н.А., Ситкин Б.В., Самуилов В.Д. // Биохимия. - 65 (11). - 2000. - С. 1546-1550.
4. Решетникова И.А. // Биотехнология пероксидаз растений и грибов. - Итоги науки и техники. Серия Биотехнология. - М., 1992. - Т. 36. - С. 104-126.
5. Решетникова И.А., Газарян И.Г., Вережкин А.Н., Фечина В.А., Мирошниченко Т.Г., Егоров А.М. // Микология и фитопатология. - 1992. - 26 (5). - С. 383-387.
6. Gramss G. // J. Basic Microbiol. - 1997. - 37 (6). - P. 407-423.
7. Heinzkill M., Bech L., Halkier T., Schneider P., Anke T. // FEMS Microbiol. Lett. - 1998. - 64 (5). - P. 1601-1606.
8. Krüger G., Pfeil E. // Arch. Microbiol. - 1976. - 109 (1-2). - P. 175-179.
9. Łobarzewski J. // Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska: Sec. C. - 1971. - 26 (5). - P. 35-43.
10. Lyr H. // Planta. - 1956. - V. 48. - P. 239-265.
11. Mustranta A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1987. - V. 27. - P. 21-26.
12. Nakayama T., Amachi T. // J. Mol. Catal. B: Enzymatic. - 1999. - V. 6. - P. 185-198.
13. Shin K.S., Lee Y.J. // Mycologia. - 2000. - 92 (3). - P. 537-544.
14. Shinmen Y., Asami J., Amachi T., Shimizu S., Yamada H. // Agric. Biol. Chem. - 1986. - V. 50. - P. 247-249.