

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЛЮКОЗООКСИДАЗ МУТАНТНЫХ ШТАММОВ *PENICILLIUM FUNICULOSUM*

Т.В. Семашко

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

Ферменты играют важную роль в процессах жизнедеятельности организмов. Они необходимы для осуществления технологических процессов и широко используются в различных отраслях химической, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, медицине и научных исследованиях. Одним из таких теоретически и практически значимых ферментов является глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4).

Ранее нами исследована спонтанная и индуцированная изменчивость продуцента внеклеточной глюкозооксидазы *Penicillium funiculosum* БИМ F-15. Получены мутантные штаммы: *P. funiculosum* БИМ F-15.3 и *P. funiculosum* 46.1, изучены особенности роста данных штаммов и синтеза ими глюкозооксидающего фермента [1-3].

Цель данных исследований - выделить и охарактеризовать глюкозооксидазы *P. funiculisum* БИМ F-15.3 и 46.1.

Грибы выращивали на жидкой питательной среде [1]. По окончании культивирования биомассу грибов отделяли фильтрованием, а фильтрат культуральной жидкости использовали для выделения глюкозооксидаз методом адсорбции «в объеме». Фермент сорбировали на гидроокиси цинка и элюировали 0,02-0,35М растворами NaH_2PO_4 , pH 6,0. Полученные фракции, содержащие глюкозооксидазу, концентрировали на мембране ПАН с номинальным молекулярно-массовым пределом задержания 10 кДа. Активность глюкозооксидаз определяли спектрометрически [4, 5]. При исследовании свойств глюкозооксидаз проверяли: влияние активной кислотности в диапазоне pH 2,0-12,0 и температуры в интервале 20-80°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 30 и 60 мин прогревания при 20-80°C в цитратном буфере, pH 5,0.

Установлено, что наибольшее число сопутствующих белков десорбировалось 0,02М NaH_2PO_4 , а максимальное количество глюкозооксидаз элюировалось 0,1М и 0,2М NaH_2PO_4 .

Для определения степени очистки глюкозооксидаз был проведен спектральный анализ препаратов. Как известно из литературных данных, отношение максимумов поглощения в видимой области спектра (при длинах волн 370/455) характеризует степень очистки фермента [6]. Для высокоочищенных препаратов глюкозооксидаз грибов *Penicillium amagasakiense* и *Aspergillus niger* этот показатель составлял 0,93-1,0. При элюции глюкозооксидаз *P. funiculosum* БИМ F-15.3 и 46.1 0,2М NaH_2PO_4 получены очищенные препараты ферментов ($\lambda_{370}/\lambda_{455}=1,10-1,13$) с удельной активностью 298,0-330,7 ед/мг белка, что в 3,9-4,1 раза превышает данный показатель в фильтрате культуральной жидкости грибов.

По данным электрофоретического анализа глюкозооксидаза *P. funiculosum* БИМ F-15.3, независимо от молярности сорбента, представлена одной молекулярной формой фермента ($R_f=0,34-0,35$). Препараты фермента *P. funiculosum* 46.1, полученные при десорбции 0,1-0,2М NaH_2PO_4 , также содержали одну молекулярную форму с аналогичной электрофоретической подвижностью, а элюированные 0,35М NaH_2PO_4 - 2 молекулярные формы с R_f 0,34-0,35 и 0,40-0,41.

Установлено, что молекулярная масса субъединиц глюкозооксидаз *P. funiculosum* БИМ F-15.3 и 46.1 составляет 75- и 68 кДа.

По результатам изоэлектрофокусирования глюкозооксидаза *P.funiculosum* БИМ F-15.3 во всех фракциях представлена 2 молекулярными формами (pI 3,8-4,2), а фермент *P.funiculosum* 46.1 - 4 формами (pI 3,8-4,8).

Очищенные препараты были использованы для анализа основных физико-химических свойств глюкозооксидаз штаммов *P. funiculosum*.

Установлено, что оптимальные условия для действия глюкозооксидаз *P.funiculosum* БИМ F-15.3 и 46.1 создавались в диапазоне температур 55-60⁰С. Анализ рН-оптимума действия ферментов мутантов показал, что, в отличие от глюкозооксидазы *P.funiculosum* БИМ F-15.3, максимальная активность фермента *P. funiculosum* 46.1 проявлялась в более широком диапазоне рН (4,0-9,0).

Глюкозооксидазы грибов характеризовались высокой стабильностью в щелочной зоне рН. После часовой выдержки при рН 9,0 и 10,0 остаточная активность составляла 90 и 73%.

Незначительные отличия были отмечены по термостабильности ферментов. Глюкозооксидаза *P. funiculosum* 46.1 после 30-минутного прогревания при 40⁰С сохраняла 95% активности, а после 60-минутного - 79%, тогда как, фермент *P.funiculosum* БИМ F-15.3 - 76 и 67%, соответственно.

Показано, что изучаемые ферменты имели высокую специфичность к глюкозе ($K_m=15,0-19,5$), менее эффективно катализировали окисление 2-дезоксид-глюкозы, мальтозы, галактозы, ксилозы и не катализировали окисление арабинозы, лактозы, маннита, фруктозы, сахарозы. Фермент *P.funiculosum* 46.1 характеризовался более высокой скоростью окисления глюкозы и мальтозы.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получены препараты глюкозооксидаз различной степени очистки, установлена гетерогенность ферментов, изучены их основные физико-химические свойства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михайлова Р.В., Семашко Т.В., Лобанок А.Г., Осока О.М // Микология и фитопатология. 2001. Т. 35. Вып. 5. С.73-79.
2. Михайлова Р.В., Семашко Т.В., Лобанок А.Г. // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т.38, №3. С.273 -277.
3. Семашко Т.В., Михайлова Р.В., Лобанок А.Г.// Микробиология 2004. Т.73, №3. С.343-349.
4. Ciucu A., Patroescu C. // Analytical letters. 1984. 17 (B12). P.1417-1427.
5. Markwell J., Frakes L.G., Brott E.C., Osterman J., Wagner F.W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. V.30, №2. P.166-169.
6. Yoshimura T., Isemura T. // J. Biochemistry. 1971. Vol.69, №5. P.839-846.