

**БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРОКСИДАЗЫ
ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА
PHELLINUS ROBUSTUS**

Л. А. Артюшевская

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время пероксидазы (КФ 1.11.1.1 – 1.11.1.14) находят широкое применение в различных отраслях биотехнологии. Так, например, пероксидаза из корней хрена, которая на сегодняшний момент является лидером по объему практического использования, применяется в биохимическом анализе и в иммуноферментной клинико-лабораторной диагностике, в производстве биосенсоров, служит для очистки сточных вод, детоксикации мутагенных и канцерогенных соединений-ксенобиотиков, используется в биосинтетических реакциях получения биологически активных соединений и др.

Используемые в настоящее время препараты пероксидаз, как правило, обладают высокой активностью, приемлемой субстратной специфичностью, доступностью природного сырья, оборудования и реактивов для их получения и очистки. Однако, в виду ряда существующих проблем (существование множественных форм данного фермента, для которых характерны различия в каталитических и регуляторных свойствах и стабильности; ограниченность сайтов ковалентной химической модификации, а также постоянный рост цен на коммерческие препараты) актуальным является поиск новых источников ферментов данного класса.

В этой связи большой интерес представляют пероксидазы грибного происхождения, так как, по имеющимся в литературе данным, среди них встречаются очень интересные представители, такие как негемовые пероксидазы, ванадий-содержащие, лигнин- и Mn-зависимые пероксидазы. Кроме того, с внедрением пероксидаз, выделенных из грибов, может быть существенно расширен спектр окисляемых субстратов и получена возможность проводить данные реакции в условиях, отличающихся от таковых для используемых сейчас пероксидаз. Немаловажным является и высокая производительность штаммов-продуцентов. [1]

Данные исследования проводились с целью определения субстратной специфичности пероксидазы базидиального гриба *Phellinus robustus*, влияния модификаторов на ее активность и проверки гипотезы о принадлежности данного фермента к классу гем-содержащих пероксидаз. Мате-

риал для исследований был любезно предоставлен нам лабораторией энзимологии Института микробиологии НАН Беларуси.

МЕТОДЫ

Пероксидазу базидиального гриба *Phellinus robustus* очищали из ультрафильтрационного концентрата фильтрата культуральной жидкости методом препаративного электрофореза в неденатурирующих условиях, разделяя белки в вертикальных пластинках ПААГ Т 10%, С 2,6%. [2]

После электрофореза фермент выявляли в геле, окрашивая контрольную полоску геля на пероксидазную активность, в качестве субстрата использовался о-дианизидин. Затем проводили элюирование пероксидазы из соответствующей области геля в 0,05 М Na-фосфатном буфере, рН 5,8.

Активность пероксидазы определяли путем измерения скорости окисления таких субстратов пероксидазных реакций как тетраметилбензидин (ТМБД, ариламин) и кверцетин (полифенол). За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует реакцию превращения 1 мкМ субстрата с максимальной скоростью за 1 сек.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ скорости окисления 5 испытанных субстратов препаратом пероксидазы показал, что ферментативная активность (мкМ/с) уменьшается (табл. 1) в ряду: аскорбиновая кислота (0,150), тетраметилбензидин (0,114), $K_3[Fe(CN)_6]$ (0,108), кверцетин (0,058) и НАДН (0,003).

С целью уточнения структурных характеристик, а также для того, чтобы проверить выдвинутую гипотезу о принадлежности исследуемого фермента к классу гемовых пероксидаз и для выяснения того, входит ли железо в состав активного центра, были выбраны следующие модификаторы: NaN_3 (лиганд по гемму), тиомочевина (ингибитор пероксидаз), мочевины (реагент, вызывающий дефолдинг белка, и позволяющий определить характер связей между простетической группой и ферментом), ЭДТА (неспецифический комплексообразователь металлов), додецилсульфат натрия (ДСН) (соединение, вызывающее денатурацию белка), дефероксамин (специфический комплексообразователь Fe^{2+}/Fe^{3+}).

Таблица 1

Субстратная специфичность пероксидазы
из культуральной жидкости *Phellinus robustus*

Субстраты	Кверцетин	Тетраметилбензидин	Аскорбат	NADH	Ферроцианид
Активность, мкМ/с	0.058	0.114	0.150	0.003	0.108

Таблица 2

Влияние модификаторов на активность пероксидазы

Модификаторы	NaN ₃ , 1 мМ	Тиомочевина, 1 мМ	Мочевина, 3М	ЭДТА, 1 мМ	SDS, 0,05%
А-ть,% к контролю без модификатора	92	14	56	0	140

Исследование влияния модификаторов на активность пероксидазы *Ph.robustus* К показало (табл. 2), что при добавлении NaN₃ в реакционную смесь начальная скорость реакции замедлялась на 8% по сравнению с контролем. Через 2 мин от начала реакции кинетическая кривая выходила на плато, степень окисления тетраметилбензидина снизилась на 39% по сравнению с аналогичным показателем в контрольном варианте. Это позволяет предположить, что гем играет непосредственную роль в окислении субстратов.

При использовании тиомочевины степень окисления субстрата пероксидазой *Ph.robustus* К снизилась до 23%. Добавление мочевины в реакционную смесь приводило к снижению скорости реакции на 40%, но выхода кинетической кривой на плато не наблюдали.

Установлено, что добавление ЭДТА в реакционную смесь с ферментом *Ph.robustus* К не влияет на скорость окисления электронодонорного субстрата.

Особо следует отметить, что ДСН значительно увеличивает скорость реакции, катализируемой пероксидазой *Ph.robustus* К, что может быть обусловлено повышением растворимости образующихся продуктов окисления тетраметилбензидина.

Изучение влияния дефероксамина, комплексообразователя железа с высокой константой связывания, на скорость окисления тетраметилбензидина, показало дозозависимое (0,5–1,0 мМ) ингибирование ферментативной активности, достигающее максимального значения (69%) при использовании 1,0 мМ дефероксамина. В качестве сравнения можно отметить, что внесение 1,0 мМ дефероксамина в реакционную среду с пероксидазой хрена приводит к снижению начальной скорости реакции (0,07 мкМ/с) в 2 раза по сравнению с контролем (0,141 мкМ/с), а в последствии, и к полному ингибированию реакции.

Добавление MnSO₄ при измерении активности по ТМБД не вызывало эффекта ускорения, который характерен для Mn-зависимых пероксидаз, следовательно, окисление субстратов происходит без участия ионов Mn.

Из изложенных результатов можно предположить, что, как и другие неспецифические пероксидазы грибов, пероксидаза *Ph.robustus* К является гем-содержащим ферментом.

Литература

1. *Nakayama T., Amachi T.* Fungal peroxidase: its structure, function, and application // *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 1999. Vol. 6. P. 185–198.
2. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1981. – 288 с.

СИНТЕЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ РАСТЕНИЙ

А. А. Булатова, Ю. В. Асташева

Культура клеток растений привлекательное альтернативное целому растению средство для получения ценных вторичных метаболитов. Растительные клетки тотипотентны, т.е. каждая клетка в культуре содержит полную генетическую информацию и, следовательно, сохраняет способность синтезировать весь спектр соединений, найденных в родительском растении.

В настоящее время возможность использования культур растительных клеток для получения биологически активных соединений общепризнана. Некоторые растительные культуры клеток синтезируют вторичные метаболиты даже в больших количествах, чем в интактном растении. Однако применение культур растительных клеток для промышленного синтеза сопряжено с рядом проблем (медленный рост культуры, способность клеток к агрегации, выращивание в строго асептических условиях, чувствительность к механическим повреждениям и т.д.), ограничивающих их внедрение в производство [1].

На сегодняшний день разработаны стратегии для увеличения синтеза вторичных метаболитов культурами клеток растений. К числу последних принадлежит иммобилизация. Под иммобилизацией понимают метод, который закрепляет каталитически активный фермент или клетки на носителе и предотвращает их поступление в жидкую фазу.

Иммобилизация может значительно влиять на клеточную физиологию и образование вторичных метаболитов. В некоторых случаях иммобилизация приводит к заметному увеличению продукции вторичных метаболитов.

Первым требованием при выборе способа иммобилизации является сохранение метаболической активности клеток и, следовательно, мягкость метода, позволяющая сохранить основные физиолого-биохимические функции обрабатываемого объекта. Чаще всего для иммобилизации растительных клеток используют мягкие гелевидные системы. Наиболее широко используется в качестве матрикса – Са-альгинат. Кроме того, используют и другие гели, такие как агар, агароза, желатин,