



Оксидазная и пероксидазная активность экстрактов мицелия Вёшенки обыкновенной

Кравченко Е.М., Одарюк И.Д.,

Калач И.Е., Прокопова А.В.

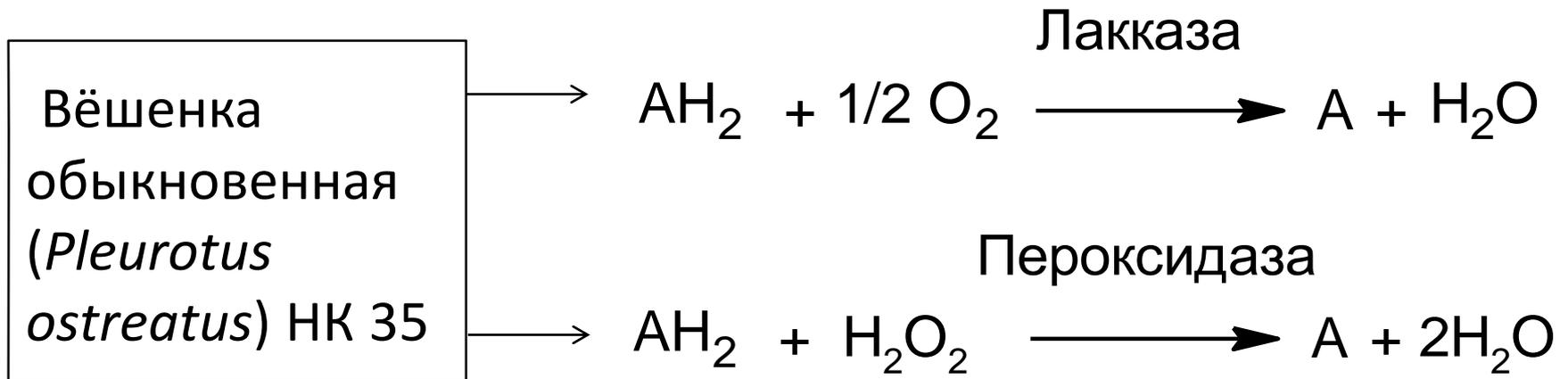
Кафедра биохимии и органической химии

ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»

г. Донецк

Использование ферментов дереворазрушающих грибов:

- катализ в органическом синтезе и получении полимеров
- биodeградация отходов, бесхлорное отбеливание
- создание биосенсоров, кинетических методик анализа



Задачи поиска эффективных продуцентов и методик получения ферментных препаратов требуют простоты методик определения количества ферментов.

Сложный состав водного экстракта мицелия (другие белки, сахара, аминокислоты, фенолы и т.д.) затрудняет использование традиционных методов определения белков:

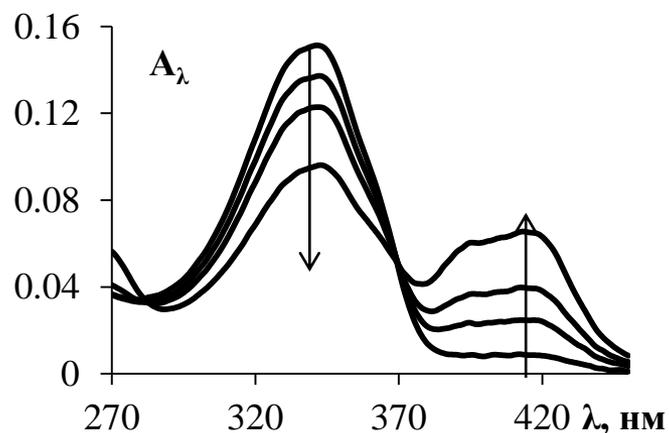
- Поглощение света в УФ-области связано с большинством компонентов, не только с белком;
- Методы, основанные на окрашивании белков красителями, недостаточно чувствительны;
- Завышенный результат гравиметрии – осаждаются не только белки;
- На определение по методу Лоури влияют фенолы.



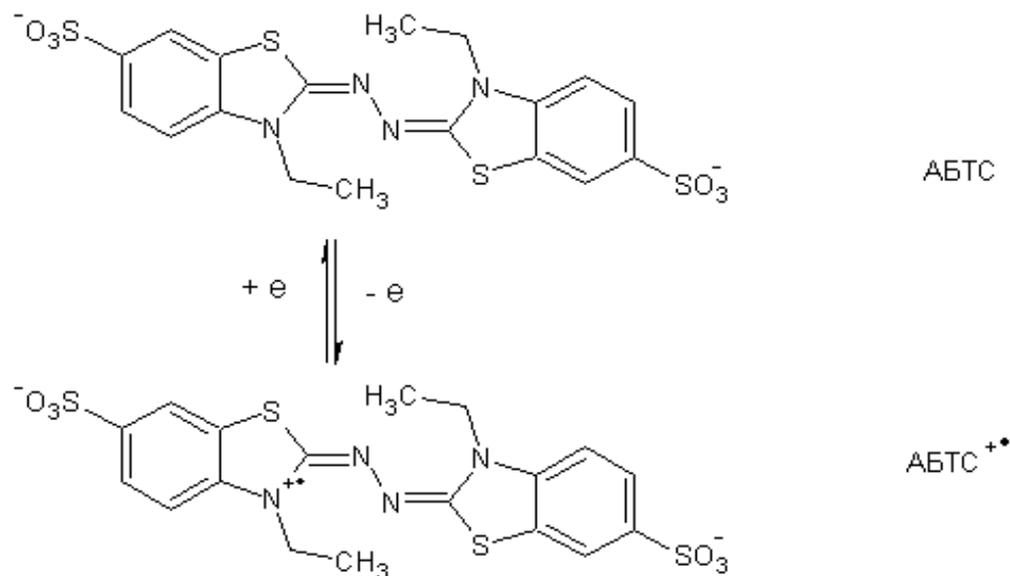
Предпочтительны кинетические методы определения количества ферментов.

ABTS – удобный субстрат для спектрофотометрического определения лакказной и пероксидазной активности:

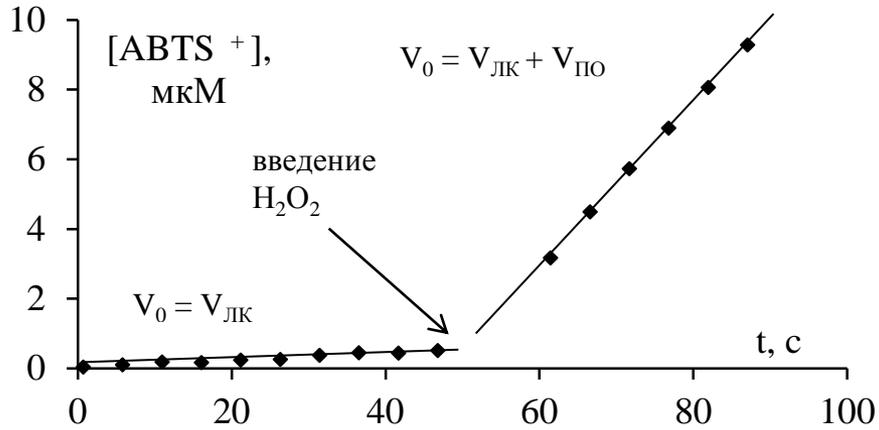
- Высокая скорость оксидазного и пероксидазного окисления;
- ABTS не взаимодействует с ионами металлов (Fe^{2+} и Cu^{2+}), H_2O_2 , пероксидазой в отсутствие H_2O_2 , неокисленными фенолами (или скорость пренебрежимо мала); продукт его окисления $\text{ABTS}^{\bullet+}$ также стабилен;
- Высокие значения коэффициентов экстинкции субстрата и продукта;
- Небольшие концентрации H_2O_2 почти не влияют на лакказную активность, скорости лакказного и пероксидазного окисления можно считать аддитивными и определять в одной реакционной смеси (при pH 4,6 проявляется и лакказная, и пероксидазная активности экстракта исследуемого мицелия).



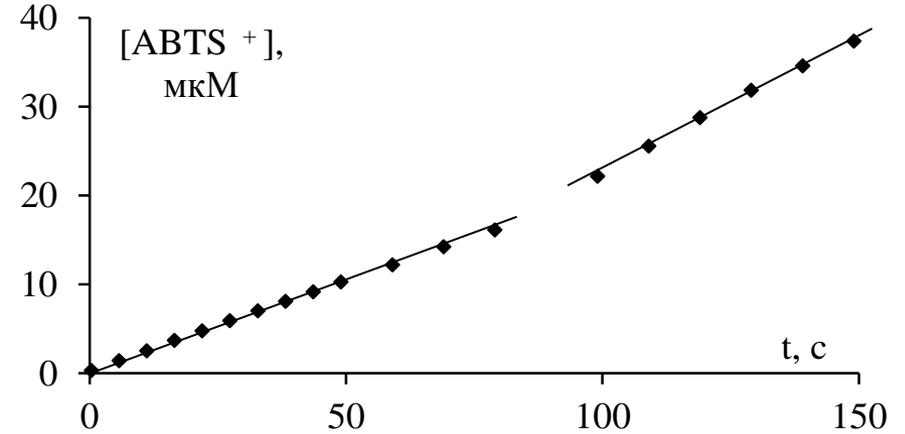
Изменение спектральных полос поглощения субстрата (341.5 нм) и продукта (414 нм) во времени в реакции лакказного окисления ABTS.



Лакказная и пероксидазная активность экстракта мицелия



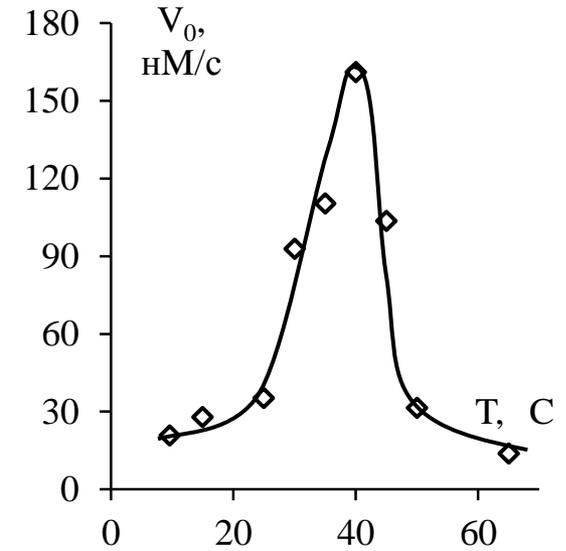
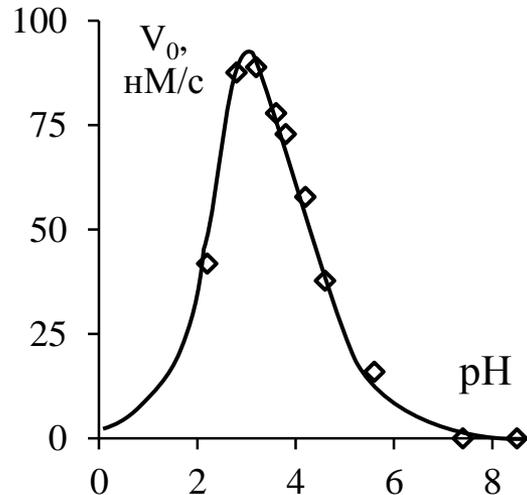
Окисление ABTS в присутствии смеси лакказы *Trametes versicolor* и пероксидазы хрена (модельная смесь).



Окисление ABTS в присутствии экстракта Вёшенки обыкновенной НК 35.

Окисление ABTS связано с ферментами:

- При использовании прокипяченного экстракта ABTS не окисляется;
- Температурный и pH-оптимумы лакказной активности экстракта:



Влияние фенолов на определение ферментов:

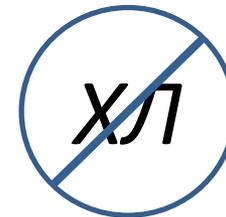
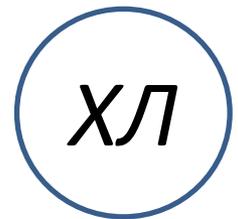
- Завышенный результат при определении по методу Лоури;
- Конкуренция за активный центр ферментов при использовании кинетических методик определения активности (занижение результата);
- Восстановление ABTS + многими фенолами при использовании в качестве субстрата ABTS.



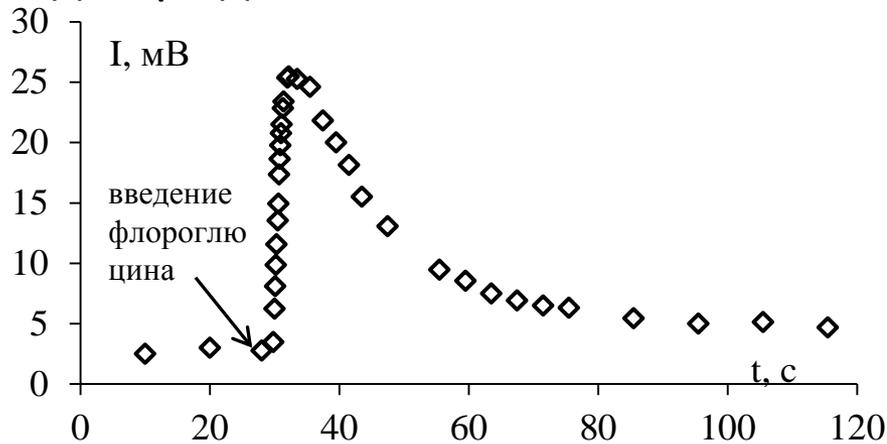
Необходима методика определения фенолов в экстрактах мицелия

Использование хемилюминесцентного (ХЛ) метода для определения фенолов:

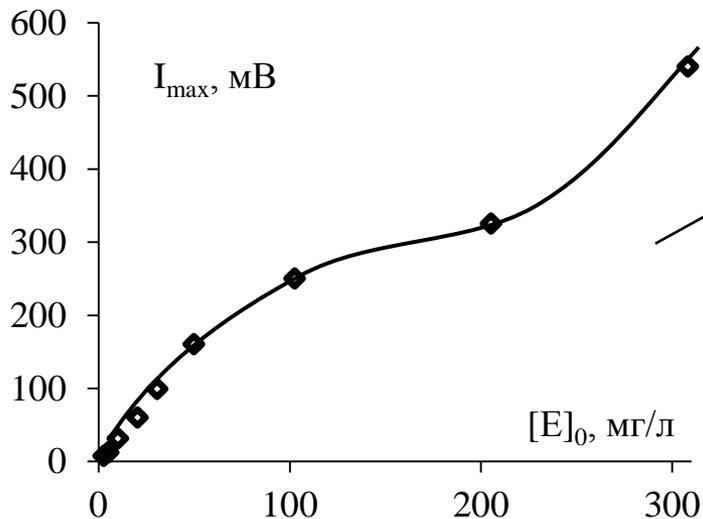
- Окисление в слабокислой водной среде в присутствии лакказы *Trametes versicolor*: трехатомные фенолы (включая флороглюцин), некоторые двухатомные и их производные, кроме гидрохинона и пирокатехина.
- Автоокисление в водно-щелочной среде: двух-, трехатомные фенолы и их производные (кроме мета-замещенных).
- Окисление аминокислот, моносахаридов, одноатомных фенолов, ароматических аминов



ХЛ при введении трехатомных фенолов к экстракту в слабокислой среде - подтверждение наличия лакказы



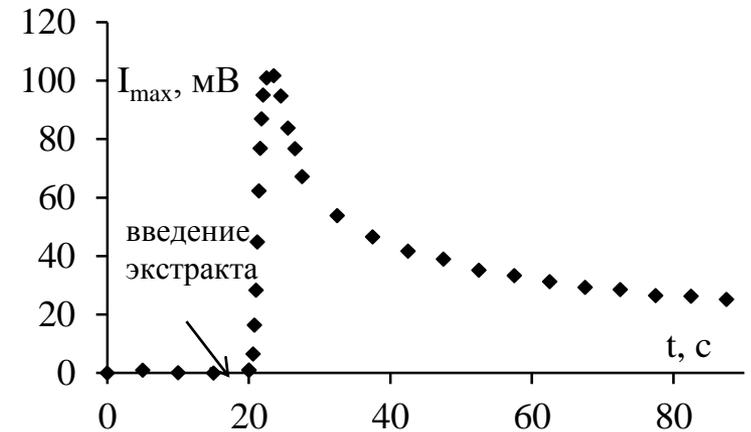
Кинетическая кривая ХЛ при окислении флороглюцина в присутствии экстракта мицелия.



Возможна оценка содержания фермента по интенсивности свечения

Зависимость максимальной интенсивности ХЛ при окислении флороглюцина от концентрации лакказы *Trametes versicolor*

ХЛ экстракта в водно-щелочной среде - подтверждение наличия фенолов



Кинетическая кривая ХЛ при автоокислении компонентов экстракта в водно-щелочной среде.

Выводы:

- Установлена лакказная и пероксидазная активность водного экстракта мицелия Вёшенки обыкновенной НК 35;
- ABTS – перспективный маркер определения лакказной и пероксидажной активности ;
- Совместное использование хемилюминесцентного и спектрофотометрического методов позволяет учесть влияние примесных веществ и повысить точность определения.