ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2020, том 490, 49–54

УДК 577.332.23: 539.199

ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ОКСИДАЗЫ БАЗИДИОМИЦЕТА *Neonothopanus nambi*: ВЫДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА

© 2020 г. Н. О. Ронжин[1,*], О. А. Могильная[1], К. С. Артеменко[1], Е. Д. Посохина[1,2], В. С. Бондарь [1]

Представлено академиком РАН А.Г. Дегерменджи 29.05.2019 г.
Поступило 30.05.2019 г.
После доработки 30.05.2019 г.
Принято к публикации 30.05.2019 г.

Из мицелия базидиомицета *Neonothopanus nambi* с помощью оригинального способа обработки биомассы β-глюкозидазой впервые выделен пул экстраклеточных ферментов гриба. Гель-фильтрационной хроматографией из экстракта выделены две белковые фракции, содержащие ферменты с оксидазной активностью, условно названные Ф1 и Ф2. Фермент Ф1 имеет нативную молекулярную массу 80–85 кДа, не содержит хромофорных компонентов, однако катализирует окисление вератрилового спирта с величиной K_m = 0.52 мМ. Вероятно, данный фермент является алкоголь-оксидазой. Фермент Ф2 имеет нативную молекулярную массу около 60 кДа, является ФАД-содержащим белком и катализирует соокисление фенола с 4-аминоантипирином без добавки экзогенного пероксида водорода, что отличает его от известных пероксидаз. Высказано предположение, что данный фермент может быть оксидазой со смешанной функцией. Для оксидазы Ф2 величина K_m по фенолу составляет 0.27 мМ. Максимумы активности оксидаз Ф1 и Ф2 наблюдаются при температурах 22–35 и 55–70°С и pH среды 6 и 5 соответственно.

Ключевые слова: экстраклеточные оксидазы, базидиомицет *Neonothopanus nambi*, β-глюкозидаза, гель-фильтрационная хроматография, вератриловый спирт, фенол, ФАД

DOI: 10.31857/S2686738920010229

Ферменты класса оксидоредуктаз (КФ1) представляют значительный интерес для решения широкого спектра биотехнологических задач и применяются в пищевой промышленности, медицинской диагностике и экологическом мониторинге [1]. В частности, ферменты этого класса привлекают внимание исследователей как высокоселективные биомаркёры для создания эффективных средств биомедицинской аналитики. Например, изучаются возможности конструирования новых индикаторных и диагностических тест-систем с помощью иммобилизации глюкозооксидазы и пероксидаз на различных типах носителей, включая наночастицы разной физико-химической природы [2–4].

Надо сказать, что учёные многих стран проводят поиск новых источников сырья для получения ферментов с оксидазной функцией. В настоящее время заметный интерес исследователи проявляют к использованию в аналитических приложениях оксидаз высших грибов [5–7]. Это стимулирует исследования, направленные на обнаружение новых видов грибов в качестве перспективных источников получения оксидазных ферментов, изучение возможностей увеличения продукции этих ферментов в грибной биомассе, выявление оксидаз с новыми свойствами. Совершенствуются методы выделения оксидазных ферментов из грибной биомассы, разрабатываются способы их иммобилизации на различных носителях для повышения устойчивости к воздействию негативных факторов и сохранения каталитической активности при многократном использовании [8–10].

Недавно мы предложили оригинальный способ обработки мицелия высших грибов β-глюкозидазой и хитиназой, позволивший без разрушения грибной биомассы выделить из двух видов базидиомицетов экстраклеточные пероксидазы и глюкозоксидазу [11, 12]. В свою очередь, иммобилизация этих ферментов на модельный носитель (наноалмазы взрывного синтеза) позволила создать бифункциональную индикаторную систему многократного действия, которая может быть ис-

[1] *Институт биофизики Федерального исследовательского центра "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук", Красноярск, Россия*
[2] *Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*
**e-mail: roniol@mail.ru*

пользована для целей медицинской и экологической аналитики [13].

Настоящая работа посвящена выделению экстраклеточных оксидаз из мицелия базидиомицета *Neonothopanus nambi* с помощью обработки биомассы β-глюкозидазой и изучению их некоторых свойств.

В экспериментах использовали мицелий светящегося высшего гриба *N. nambi* IBSO 3293 из Коллекции микроорганизмов (CCIBSO 836) ИБФ СО РАН, ФИЦ "КНЦ СО РАН" (Красноярск). Биомассу мицелия получали при культивировании гриба в картофельно-сахарозной среде в погруженных условиях по разработанной нами ранее технологии [12], выращивание проводили в течение 7–9 суток. Полученные пеллеты мицелия извлекали из питательной среды и многократно промывали деионизованной (ДИ) водой (Milli-Q system, "Millipore", США) для удаления остатков питательной среды и метаболитов. Для получения пула экстраклеточных ферментов (в том числе оксидаз) пеллеты мицелия обрабатывали β-глюкозидазой (КФ 3.2.1.21) из сладкого миндаля ("Serva", Германия), исходный раствор которой готовили в 10 мМ фосфатном буфере (pH 6.0). Отмытые пеллеты помещали в свежую порцию ДИ воды, добавляли раствор β-глюкозидазы до конечной концентрации фермента 0.5 МЕ/мл и инкубировали при 25°C в течение 24 ч при медленном перемешивании со скоростью 80 об/мин на шейкере OS-10 ("BIOSAN", Латвия). По завершении инкубации жидкую часть (водный экстракт) отделяли от биомассы пеллет фильтрацией через бумажный фильтр. Для концентрирования выделенных экстраклеточных ферментов и удаления низкомолекулярных балластных соединений экстракт диализовали ультрафильтрацией через мембрану с пределом исключения 30 кДа ("EMD Millipore Amicon, Darmstadt", Германия). В ходе ультрафильтрации в диализуемом образце трижды заменяли ДИ воду для более полного удаления низкомолекулярных примесей. Полученную после диализа надмембранную фракцию (концентрат ферментов) отбирали и использовали для исследований.

Разделение экстраклеточных ферментов, выделенных из мицелия *N. nambi*, проводили гельфильтрационной хроматографией ферментного концентрата на колонке (1.6 × 33 см) с Sephadex G-200 ("Pharmacia", Швеция), уравновешенной раствором 50 мМ NaCl. На колонку наносили 2 мл концентрата, в который был добавлен хлорид натрия до концентрации 50 мМ. Хроматографию проводили при скорости протока 0.2 мл/мин, используя в качестве элюента водный раствор 50 мМ NaCl и собирая пробы объёмом по 2 мл. Для сравнительной оценки нативной молекулярной массы белков, полученных при хроматографии ферментного концентрата, при указанных выше условиях (размер колонки, объём наносимого образца, элюент и скорость протока) проводили хроматографию маркерных белков – БСА ("Sigma", США) и цитохрома С ("Fluka", Германия).

Концентрацию белка в ферментном концентрате и пробах после его хроматографии определяли микробиуретовым методом, используя БСА в качестве стандарта. Оценку проводили спектральным методом по величине оптической плотности образцов при 330 нм (спектрофотометр UV-1800, "Shimadzu", Япония).

Наличие оксидазной активности в концентрате ферментов и полученных хроматографических фракциях оценивали с помощью реакции соокисления фенола с 4-аминоантипирином (4-ААП) и реакции окисления вератрилового спирта. Для этого использовали 4-ААП (1-фенил-2,3-диметил-4-аминопиразолон) квалификации ч.д.а. ("Реахим", Россия), фенол ("Fluka", Германия) и вератриловый спирт ("Sigma", США), растворы которых готовили in situ в ДИ воде. При тестировании оксидазной активности с помощью первой реакции реакционная смесь объёмом 600 мкл содержала 5.96 мМ фенола; 0.49 мМ 4-ААП и 100 мкл изучаемого образца. Во втором случае реакционная смесь (600 мкл) содержала 10 мМ вератрилового спирта и 50 мкл изучаемого образца. В обоих случаях после добавления всех ингредиентов реакции образцы перемешивали в течение 3 с на Vortex-Genie 2 g-560E ("Scientific Industries, Inc.," США) и инкубировали в течение 30 мин при температуре 22°C.

Уровень оксидазной активности в образцах оценивали по выходу продуктов указанных выше реакций, регистрируемых спектральным методом (спектрофотометр UV-1800) по величине оптической плотности при длинах волн 506 и 310 нм соответственно. Активность ферментов выражали в единицах оптической плотности на 1 мг белка.

Концентрацию фенола и вератрилового спирта в реакционных смесях, а также их температуру и pH изменяли при изучении зависимостей образования продуктов реакций.

Для выделения пула экстраклеточных ферментов базидиомицета *N. nambi* (в том числе ферментов с оксидазной функцией) нами была проведена инкубация биомассы мицелия в присутствии β-глюкозидазы. В предыдущих работах мы показали, что такая обработка мицелия высших грибов сопровождается выходом их экстраклеточных пероксидаз и глюкозооксидазы в среду инкубации [12, 13]. Такой методический приём может представлять самостоятельную биотехнологическую ценность, поскольку позволяет в относительно мягких условиях (без тотального разрушения биомассы) получать из базидиомицетов

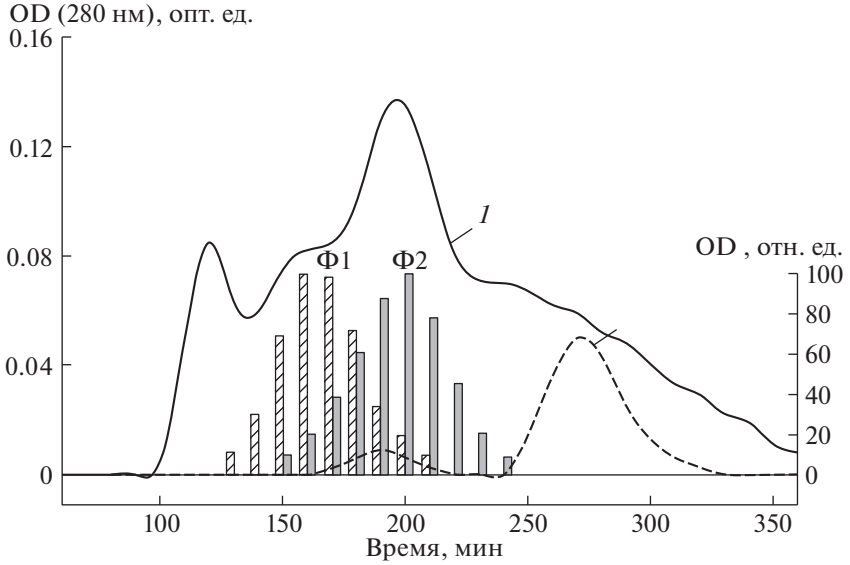

Рис. 1. Гель-фильтрационная хроматография белковых препаратов на колонке Sephadex G-200: *1* – концентрат экстраклеточных ферментов из гриба *N. nambi*, *2* – маркерные белки (БСА – 66.5 кДа и цитохром С – 12.3 кДа). Ф1 и Ф2 – распределение в хроматографических пробах активности оксидаз, катализирующих окисление вератрилового спирта и соокисление фенола с 4-аминоантипирином соответственно.

экстракты, обогащенные экстраклеточными грибными ферментами и содержащие малое количество балластных примесей.

На начальном этапе исследований в данной работе мы установили, что водные экстракты, полученные после инкубации пеллет мицелия *N. nambi* с β-глюкозидазой, содержат экстраклеточные ферменты гриба, обладающие оксидазной активностью и катализирующие окисление вератрилового спирта и соокисление фенола с 4-аминоантипирином. Об этом свидетельствовало образование продуктов при проведении указанных реакций.

Гель-фильтрационная хроматография концентрата экстрагированных из гриба *N. nambi* экстраклеточных ферментов на колонке с Sephadex G-200 позволила выявить две белковые фракции, которые обладали оксидазной активностью (рис. 1). Как видно из представленных данных, белковая фракция с нативной молекулярной массой белка 80–85 кДа содержит фермент, который катализирует окисление вератрилового спирта и, вероятно, является алкоголь-оксидазой. Данную оксидазу мы условно назвали Ф1. В белковой фракции с нативной молекулярной массой белка около 60 кДа (рис. 1) мы обнаружили фермент, катализирующий реакцию соокисления фенола с 4-аминоантипирином. При этом следует подчеркнуть, что данный фермент катализирует указанную реакцию без добавки экзогенного пероксида водорода и это отличает его от известных пероксидаз. Этой оксидазе мы дали условное название Ф2.

В экспериментах мы установили, что выделенные из базидиомицета *N. nambi* экстраклеточные оксидазы Ф1 и Ф2 могут функционировать в широких интервалах температур, однако значительно различаются температурными оптимумами каталитической эффективности (рис. 2). Из представленных данных видно, что оксидаза Ф1 проявляет максимум активности в диапазоне температур 22–35°С. При этом видно, что оксидаза Ф2 наиболее эффективно функционирует при температурах 55–70°С. Вероятно, смещение максимума функциональной активности оксидазы Ф2 в область высоких температур может быть преимуществом данного фермента при его использовании в аналитических приложениях. Однако это предположение требует отдельного исследования.

Для изучения эффективности функционирования выделенных оксидаз в зависимости от pH реакционной среды нами была использована серия 50 мМ Na-ацетатных буферов, имеющих значения pH в диапазоне от 3 до 8. Как показали эксперименты (рис. 3), оксидаза Ф2 проявляет наибольшую активность в очень узком диапазоне слабокислых значений pH среды с максимумом каталитической эффективности при pH 5. В то же время из представленных данных видно (рис. 3), что оксидаза Ф1 может эффективно функционировать в более широком диапазоне значений pH среды (от нейтрального до слабокислых), проявляя наибольшую активность при pH 6.

По данным проведенных нами исследований зависимостей выхода продуктов реакций, катали-

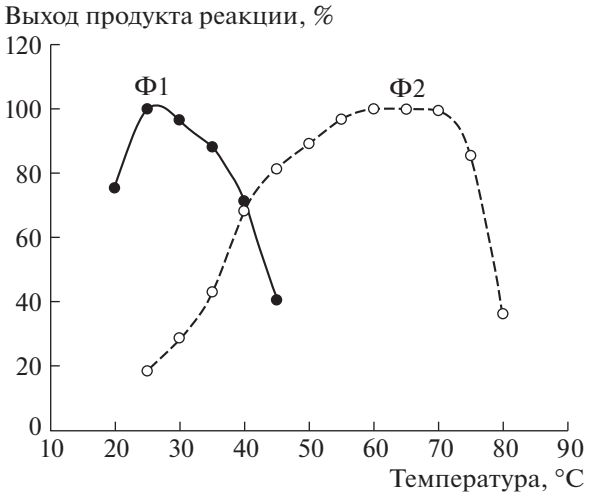

Рис. 2. Образование продуктов реакций, катализируемых выделенными из базидиомицета *N. nambi* экстраклеточными оксидазами Ф1 и Ф2, в зависимости от температуры реакционной среды. Представленные данные нормированы на максимальные значения выхода соответствующих продуктов в рядах измерений. Оценка образования продуктов проведена после инкубации соответствующих реакционных смесей в течение 15 мин при разных температурах (термостат ТВ-85 Thermo Batch, "Shimadzu", Япония).

Рис. 3. Образование продуктов реакций, катализируемых выделенными из базидиомицета *N. nambi* экстраклеточными оксидазами Ф1 и Ф2, в зависимости от pH среды. Представленные данные нормированы на максимальные значения выхода соответствующих продуктов в рядах измерений.

зируемых выделенными оксидазами Ф1 и Ф2, величины кажущихся K_m для вератрилового спирта и фенола составили 0.52 и 0.27 мМ соответственно.

При изучении спектральных характеристик образцов экстраклеточных оксидаз, выделенных из гриба *N. nambi*, мы установили, что оксидаза Ф2 является ФАД-содержащим ферментом, в то время как оксидаза Ф1 не содержит в своей структуре каких-либо хромофорных компонентов. Из результатов спектрального анализа видно (рис. 4), что спектр поглощения водного образца оксидазы Ф1 соответствует типичному белковому спектру с единственным максимумом оптической плотности при 279 нм. В то же время в спектре поглощения водного образца оксидазы Ф2, помимо белкового пика (279 нм), регистрируются дополнительные пики оптической плотности при 390 и 457 нм (рис. 4). Это свидетельствует в пользу того, что в молекуле фермента Ф2 имеется ФАД. Хорошо известно, например, [8], что наличие таких пиков наблюдается в спектрах поглощения ФАД-содержащих ферментов. Результаты дополнительных экспериментов свидетельствуют в пользу того, что ФАД не связан с белковой частью молекулы фермента ковалентно. Мы показали, что после термообработки образца оксидазы Ф2 при 100°C в течение 5 мин и последующего его диализа через мембрану с пределом исключения 10 кДа ФАД обнаруживается спектрофотометрически в подмембранной фракции (спектр поглощения не приводится).

Полученные в исследованиях оксидазы Ф2 данные (катализ соокисления фенола с 4-аминоантипирином без добавления экзогенного пероксида водорода, наличие ФАД в молекуле фермента), позволяют высказать требующую дальнейшего изучения гипотезу, что данный фермент может быть оксидазой со смешанной функцией. По-видимому, оксидаза Ф2 при наличии фенола в водной среде сначала генерирует пероксид водорода, который затем используется в реакции соокисления фенола с 4-аминоантипирином. Мы полагаем, что высказанная версия представляется правомочной, поскольку известны ФАД-содержащие ферменты, обеспечивающие образование H_2O_2 за счёт окисления циклических ОН-содержащих соединений (например, ароматических спиртов) и O_2 водной среды [14, 15]. Следует также сказать, что изучение структурно-функциональных особенностей обнаруженной оксидазы Ф2 представляет не только фундаментальный интерес, но и имеет практическое значение. В частности, в сравнении с известными пероксидазами применение Ф2 будет упрощать методику тестирования фенола (без использования пероксида водорода).

Таким образом, из мицелия базидиомицета *N. nambi* с помощью оригинального способа обработки биомассы β-глюкозидазой впервые выделен пул экстраклеточных ферментов гриба. Гель-фильтрационной хроматографией на Sephadex G-200 из экстрактов выделены две белковые фракции, в которых обнаружены ферменты с ок-

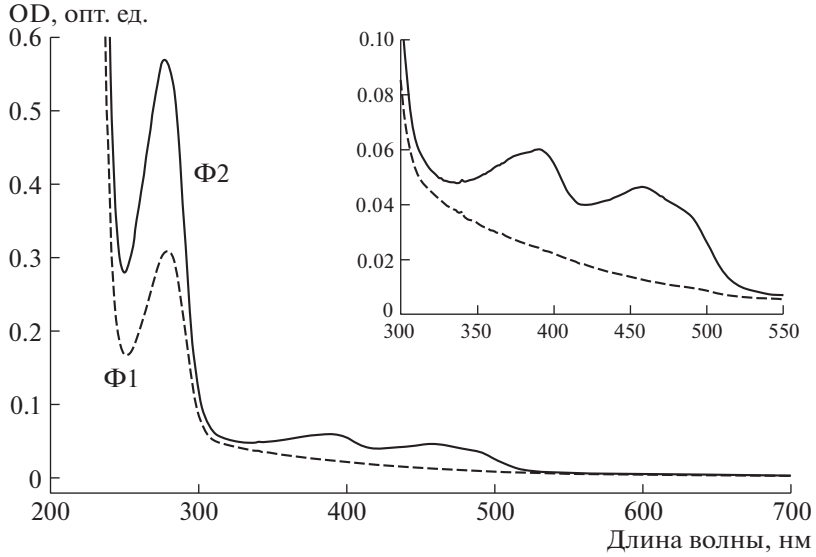

Рис. 4. Спектры поглощения водных образцов экстраклеточных оксидаз Ф1 и Ф2, выделенных из базидиомицета *N. nambi*. На врезке приведены фрагменты спектров в диапазоне 300–550 нм.

сидазной активностью, условно названные Ф1 и Ф2. Показано, что фермент Ф1 имеет нативную молекулярную массу 80–85 кДа и не содержит в своей структуре хромофорных компонентов. Данный фермент катализирует окисление вератрилового спирта и, вероятно, является алкоголь-оксидазой. Установлено, что фермент Ф2 имеет нативную молекулярную массу около 60 кДа и является ФАД-содержащим белком. Высказана гипотеза, что данный фермент является оксидазой со смешанной функцией, поскольку в отличие от известных пероксидаз катализирует реакцию сокисления фенола с 4-аминоантипирином без добавки экзогенного пероксида водорода. Совокупность результатов проведенных исследований открывает перспективы для получения выявленных экстраклеточных оксидаз гриба *N. nambi* в гомогенном виде и изучения их структурно-функциональных особенностей и применимости в биотехнологических и аналитических приложениях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Xu F.* Applications of Oxidoreductases: Recent Progress // Industrial Biotechn. 2005. V. 1. № 1. P. 38–50. https://doi.org/10.1089/ind.2005.1.38
2. *Ciaurriz P., Bravo E., Hamad-Schifferli K.* Effect of Architecture on the Activity of Glucose Oxidase/Horseradish Peroxidase/Carbon Nanoparticle Conjugates // J. Colloid and Interface Sci. 2014. V. 414. P. 73–81. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.09.039
3. *Yang H., Wei W., Liu S.* Monodispersed Silica Nanoparticles as Carrier for Co-immobilization of Bienzyme and Its Application for Glucose Biosensing // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014. V. 125. P. 183-188. https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.01.004
4. *Tan H., Guo S., Dinh N., et al.* Heterogeneous Multicompartmental Hydrogel Particles as Synthetic Cells for Incompatible Tandem Reactions // Nature Communications. 2017. V. 8. № 1:663. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00757-4
5. *Martínková L., Kotik M., Marková E., Homolka L.* Biodegradation of Phenolic Compounds by Basidiomycota and Its Phenol Oxidases: A Review // Chemosphere. 2016. V. 149. P. 373–382. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.022
6. *Martinez A.T., Ruiz-Duenas F.J., Camarero S., et al.* Oxidoreductases on Their Way to Industrial Biotransformations // Biotechnol. Advances. 2017. V. 35. № 6. P. 815–831. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.06
7. *Alneyadi A.H., Rauf M.A., Ashraf S.S.* Oxidoreductases for the Remediation of Organic Pollutants in Water – a Critical Review // Critical Rev. Biotechnol. 2018. V. 38. № 7. P. 971–988. https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1423275
8. *Tamaru Y., Umezawa K., Yoshida M.* Characterization of an Aryl-Alcohol Oxidase from the Plant Saprophytic Basidiomycete *Coprinopsis cinerea* with Broad Substrate Specificity against Aromatic Alcohols // Biotechnol. Letters. 2018. V. 40. № 7. P. 1077–1086. https://doi.org/10.1007/s10529-018-2534-3
9. *Wang N., Ren R., Jia R., et al.* Expression of a Fungal Manganese Peroxidase in *Escherichia coli*: A Comparison Between the Soluble and Refolded Enzymes // BMC Biotechnol. 2016. V. 16. № 87. https://doi.org/10.1186/s12896-016-0317-2
10. *Zdarta J., Meyer A.S., Jesionowski T., et al.* Developments in Support Materials for Immobilization of Oxidoreductases: A Comprehensive Review // Advances in Colloid and Interface Science. 2018. V. 258. P. 1–20. https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.07.004

11. *Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Artemenko K.S., et al.* Morphological Properties and Levels of Extracellular Peroxidase Activity and Light Emission of the Basidiomycete *Armillaria borealis* Treated with β-Glucosidase and Chitinase // Mycosphere. 2017. V. 8. № 4. P. 649–659.
https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/4/11

12. *Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Bondar V.S.* Estimating Levels of Light Emission and Extracellular Peroxidase Activity of Mycelium of Luminous Fungus *Neonothopanus nambi* Treated with β-Glucosidase // Current Research in Environmental & Applied Mycology. 2018. V. 8. № 1. P.75–85.
https://doi.org/10.5943/cream/8/1/6

13. *Могильная О.А., Ронжин Н.О., Артеменко К.С., Бондарь В.С.* Создание бифункционального индикаторного комплекса на основе наноалмазов и экстраклеточных оксидаз светящегося гриба *Neonothopanus nambi* // ДАН. 2018. Т. 480. № 1. С.112–116.
https://doi.org/10.7868/S0869565218130236

14. *Sützl L., Laurent C.V.F.P., Abrera A.T., Schütz G., Ludwig R., Haltrich D.* Multiplicity of Enzymatic Functions in the CAZy AA3 Family // Applied Microbiol. and Biotechnol. 2018. V. 102. P. 2477–2492.
https://doi.org/10.1007/s0025301887840

15. *Hernández-Ortega A., Ferreira P., Martinez A.T.* Fungal Aryl-Alcohol Oxidase: A Peroxide-Producing Flavoenzyme Involved in Lignin Degradation // Appl. Microbiol. and Biotechnol. 2012. V. 93. P. 1395–1410.
https://doi.org/10.1007/s0025301138368

EXTRACELLULAR OXIDASES OF BASIDIOMYCETE *Neonothopanus nambi:* ISOLATION AND SOME PROPERTIES

N. O. Ronzhin[a,#], O. A. Mogilnaya[a], K. S. Artemenko[a], E. D. Posokhina[a,b], and V. S. Bondar[a]

[a] *Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center", Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

[b] *Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation*

[#] *e-mail: roniol@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS A.G. Degermendzhy May 29, 2019

Using the original technique of treating of biomass with β-glucosidase a pool of extracellular fungal enzymes was obtained for the first time from the mycelium of basidiomycete *Neonothopanus nambi*. Two protein fractions containing enzymes with oxidase activity were isolated from the extract with gel-filtration chromatography and conventionally called F1 and F2. Enzyme F1 has a native molecular weight of 80–85 kDa, does not contain chromophore components, however, catalyzes the oxidation of veratril alcohol with $K_m = 0.52$ mM. Probably, this enzyme is an alcohol oxidase. The enzyme F2 with a native molecular weight of about 60 kDa is a FAD-containing protein and catalyzes the co-oxidation of phenol with 4-aminoantipyrine without the addition of exogenous hydrogen peroxide, which distinguishes it from the known peroxidases. It has been suggested that this enzyme may be a mixed-function oxidase. F2 oxidase has K_m value 0.27 mM for phenol. The temperature optimums of oxidases F1 and F2 are 22–35 and 55–70°C, and pH optimums are 6 and 5, respectively.

Keywords: extracellular oxidases, basidiomycete *Neonothopanus nambi*, β-glucosidase, gel-filtration chromatography, veratryl alcohol, phenol, FAD