

УДК 665.58.002.39 (088.8)

О. В. СевастьяновФизико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080, Украина**СВОЙСТВА ТИРОЗИНАЗЫ ГРИБОВ *AGARICUS BISPORUS* И ЕЕ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ЭЛИМИНИРОВАНИЯ ХЛОРЗАМЕЩЕННЫХ
ФЕНОЛОВ**

Из грибов *Agaricus bisporus* выделен частично очищенный препарат тирозиназы с увеличенной в 3 раза удельной фенолоксидазной активностью (13 мкмоль пурпурогаллина/мг белка·мин, 500 ед/ мг белка·мин, соответственно, по пирогаллолу и тирозину), с выходом белка 0,67 мг/г грибов, содержанием меди 0,19 %, рН-оптимумом 6,5, термооптимумом 40 °С). Методами SDS- и нативного электрофореза в ПААГ исследованы фракционный состав и ферментативная активность белковых фракций препарата. Выделенный фермент катализировал процесс окисления хлорпроизводных фенолов со степенью конверсии 50–100 %, зависящей от числа заместителей и их расположения в фенольном ядре; впервые для элиминирования продуктов трансформации были использованы алюмокалиевые и алюмоаммонийные квасцы.

Ключевые слова: тирозиназа, *Agaricus bisporus*, выделение, свойства, удаление хлорфенолов.

Тирозиназа (К. Ф. 1.14.18.1) — медьсодержащий фермент класса оксидоредуктаз, отвечающий за биосинтез меланина и других полифенолов в животных и растительных организмах [1]. Тирозиназа (ТИР) грибов *Agaricus bisporus* применяется в синтезе различных БАВ: антиоксидантов [2], L-ДОФА (ЛС для терапии болезни Паркинсона) [3] и др. Фермент катализирует процесс «прививки» фенолов и белков к хитозану с образованием модифицированного полимера, представляющего интерес для использования в качестве искусственной кожи и матрицы для контролируемого высвобождения лекарств [1].

ТИР широко исследуется при создании биосенсоров для определения фенолов и ароматических аминов [4], для разработки перспективных ферментативных методов удаления фенольных поллютантов [5], отличающихся селективностью, возможностью использования в широком диапазоне рН, температур, концентраций, образованию менее токсичных продуктов [1].

ТИР катализирует окисление фенольных субстратов в присутствии молекулярного кислорода до соответствующих *o*-хинонов, неферментативно олигомеризующихся до растворимых темно-окрашенных продуктов (М. м. 300–600 Да) [1], для удаления которых используют различные дорогостоящие синтетические и природные полимеры: поликонденсат гексаметилендиамина и эпихлоргидрина, полиэтиленимин, хитин, хитозан и др. [1, 6].

Однако высокая стоимость фирменных препаратов ТИР ограничивает их применение, вследствие чего перспективно использование выделенного частично очищенного энзима с достаточно высоким уровнем активности, зависящим от метода получения фермента, и удаления продуктов трансформации фенолов с использованием более экономичных коагулянтов.

Цель настоящего исследования — получение, детальное исследование биохимических характеристик ТИР грибов *Agaricus bisporus* и ее использование для удаления фенолов из растворов.

Объектами исследования были хлорзамещенные фенолы, признанные Евросоюзом и США наиболее опасными органическими поллютантами [1].

Экспериментальная часть

Тирозиназу *A. bisporus* выделяли по модифицированному методу Коэна [7]: 300 г грибов гомогенизировали в 600 см³ охлажденного экстрагента (водного раствора, содержащего 1 % аскорбиновой кислоты и 0,2 % бензойной кислоты), перемешивали в течение часа, затем центрифугировали при 11 000 об/мин 30 мин. В полученный супернатант добавляли 5 г порошка поликапроамида, 1,5 часа перемешивали, фильтровали, после чего к раствору фермента добавляли твердый сульфат аммония до 80 % насыщения и центрифугировали в аналогичных условиях. Осадок растворяли в 15 см³ дистиллированной воды и диализировали в течение 3-х суток против экстрагента, затем дистиллированной воды. Процесс выделения проводили при 0°C. В препарате ТИР содержание белка определяли методом Лоури-Хартри [8], меди — с использованием оксалилдигидразида [9], активность — по пирогаллолу и тирозину [5, 10]. В интервале значений pH 3–10 находили pH-оптимум реакции окисления фенола, используя следующие буферные растворы: 0,01 моль/дм³ пиродифосфат натрия — янтарная кислота (pH 3–5; 8–10), 0,05 моль/дм³ фосфатный NaH₂PO₄ — NaOH (pH 5,5–7). Влияние температуры на трансформацию фенола тирозиназой изучали в интервале 2–80°C при pH 6,5 и концентрации субстрата 0,5 ммоль/дм³. Степень трансформации фенолов определяли по их убыли 4-аминоантипиринным методом [11].

Фракционный состав препарата исследовали методом SDS-электрофореза в 10 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в системе Леммли на приборе «Helicon», Россия. Окрашивание осуществляли с использованием Кумасси R-250. Нативный электрофорез проводили в 10 % ПААГ по Орнштейну и Девису [12]. Одну часть геля окрашивали для выявления белковых фракций, другую — обрабатывали субстратом ТИР для выявления ферментативной активности.

Коагуляцию продуктов ферментативного окисления фенолов проводили с помощью алюмокалиевых или алюмоаммонийных квасцов, при исходных концентрациях субстратов 0,5 ммоль/дм³, коагулянтов — 1,0–3,0 г/дм³ [13].

Результаты и их обсуждение

Модификация метода выделения ТИР из грибов *Agaricus bisporus*, осуществленная нами добавлением поликапроамида на стадии получения экстракта фермента, связывающего продукты окисления полифенолов — ингибиторов ТИР — позволила увеличить фенолоксидазную активность препарата в три раза.

В результате был получен частично очищенный препарат ТИР (табл.1), с выходом белка 0,67 мг/г грибов, содержанием меди 0,19 %, удельной активностью 500 ед/мг белка·мин, с рН — оптимумом 6,5, термооптимумом — 40°C.

Таблица 1

Характеристики частично очищенного препарата тирозиназы

Исследуемые показатели	
Выход по белку, мг/г грибов	0,67
Активность по пирогаллолу, мкмоль пурпурогаллина/мг белка·мин	13
Активность по тирозину, ед/мг белка·мин	500
Содержание меди, нмоль/мг белка	29,9
рН-Оптимум	6,5
Термооптимум	40 °С

Следует отметить, что выделенный препарат сохранял высокую фенолоксидазную активность (80–100 %) в диапазонах значений рН 5,5–7,0 и температуры 20–50 °С.

Методом SDS-электрофореза в препарате выявлено 9 белковых фракций, которые можно разделить на 3 зоны. В зоне белков с высокой подвижностью определена одна фракция (R_f 0,97,) с удельной долей в спектре 27,40 %. В зоне белков средней подвижности проявляются пять белковых фракций; эту зону можно разделить на две подзоны 1 — R_f 0,67 и 0,66 (удельная доля в спектре 22,20 %) и 2 — с R_f 0,62, 0,58 и 0,55 (удельная доля в спектре 24,01 %). В зоне малоподвижных белков выявлено три фракции с R_f 0,49, 0,46 и 0,44 (удельная доля в спектре 26,45 %) (рис. 1, табл. 2).

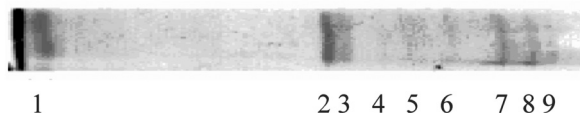


Рис. 1. Электрофореграмма препарата тирозиназы (SDS-электрофорез)

**Белково-фракционный состав тирозиназы
Agaricus bisporus (SDS-электрофорез)**

№ фракции	R _f	Удельная доля в спектре, %	М.м., кДа
1	0,97	27,40	11,5±0,7
2	0,67	10,60	25,0±1,5
3	0,66	11,60	26,0±1,3
4	0,62	5,40	30,0±2,9
5	0,58	8,25	33,0±3,0
6	0,55	10,30	35,0±3,2
7	0,49	15,20	41,0±4,2
8	0,46	8,20	45,0±4,5
9	0,44	3,05	48,0±4,0

Определенная фракция с М.м. $11,5 \pm 0,7$ кДа может соответствовать легкой субъединице молекулы ТИР, фракции с М. м. $41-48 \pm 4,5$ кДа — тяжелой субъединице; остальные фракции могут быть представлены изоформами ТИР и балластными белками. Полученные результаты не противоречат имеющимся в литературе сведениям о структуре молекулы ТИР [1]. Известно, что М.м. коммерческого препарата ТИР — 125–128 кДа, молекула фермента состоит из 2-х легких (М. м. 12–13 кДа) и 2-х тяжелых (М. м. 43–48 кДа) субъединиц. Методом нативного электрофореза в препарате ТИР выявлено 17 белковых фракций (рис. 2 табл. 3), представленных как изоформами фермента, так и агрегатами белков с полифенолами или пигментами [1], причем выраженной тирозиназной активностью обладают 12 фракций, доля которых составляет 92,5 % общего белка. Максимальная активность фермента (60,13 %) связана с белковыми фракциями 11–13, составляющими 50 % общего белка.

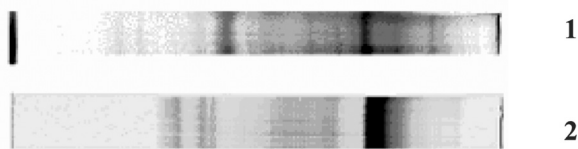


Рис. 2. Электрофореграммы (нативный электрофорез) тирозиназы: 1) — белковые фракции; 2) — ферментативная активность фракций

Таблица 3

**Фракционный состав и ферментативная активность ТИР
(нативный электрофорез)**

№	R _f	Общая часть белковых фракций в спектре, %	
		белок	ферментативная активность
17	0,10	1,20	—
16	0,14	2,80	—
15	0,17	1,80	—
14	0,21	11,60	10,10
13	0,24	11,60	60,13
12	0,28	30,20	
11	0,30	8,20	
10	0,35	9,10	8,77
9	0,40	7,20	4,23
8	0,45	2,40	3,69
7	0,48	1,70	4,31
6	0,52	1,50	—
5	0,56	9,60	1,98
4	0,61	0,80	3,12
3	0,66	0,10	3,67
2	0,71	0,10	—
1	0,78	0,10	—

Полученный препарат ТИР катализировал окисление фенола [13], моно-, три- и пентахлорфенолов (0,5 ммоль/дм³). Показано, что *p*-хлорфенол трансформировался более чем на 98 % в тех же условиях, что и фенол (активность ТИР 30 ед/см³, рН 6,5, *t* 25°С, время конверсии 3 час), тогда как для количественной конверсии *m*- и *o*-хлорфенолов необходимо увеличение концентрации фермента в 2 и 4 раза, соответственно.

Однако уровень конверсии 2,4,6-трихлорфенола, 2,4,5-трихлорфенола и пентахлорфенола составил не более 50 % как при увеличении концентрации ТИР до 180 ед/см³ (рис. 3), так и времени трансформации до 24 ч, что может быть обусловлено ингибированием фермента образующимися продуктами окисления исследуемых субстратов [14].

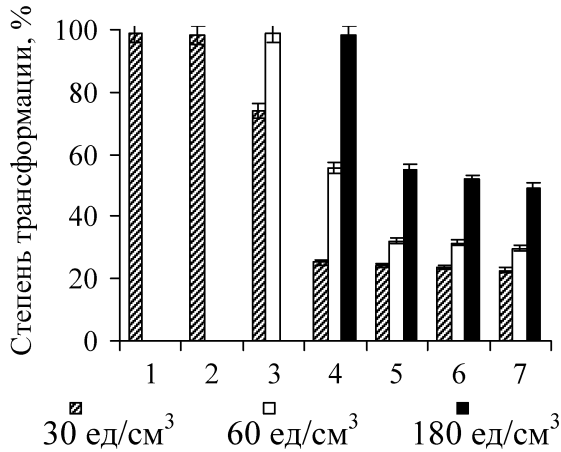


Рис. 3. Зависимость степени трансформации фенольных соединений от активности тирозиназы:

1 — фенол; 2 — *p*-хлорфенол; 3 — *m*-хлорфенол; 4 — *o*-хлорфенол; 5 — пентахлорфенол; 6 — 2,4,6-трихлорфенол; 7 — 2,4,5-трихлорфенол

Ранее нами была показана перспективность использования для удаления продуктов биоконверсии фенола алюмокалиевых и алюмоаммонийных квасцов [13]: для 97 %-ного удаления продуктов окисления 0,5 моль/дм³ фенола концентрация коагулянтов составила 1,0 г/дм³. Показано, что для удаления продуктов окисления монохлорфенолов необходимо трехкратное увеличение концентрации коагулянтов.

Т.о. изучены биохимические свойства выделенного по модифицированному методу препарата тирозиназы грибов *Agaricus bisporus*, с помощью которого осуществлено окисление хлорпроизводных фенолов со степенью трансформации 50–100 %, зависящей от числа и расположения заместителей в фенольном ядре, впервые для элиминирования продуктов трансформации были использованы алюмокалиевые и алюмоаммонийные квасцы.

Литература

1. Halaoui S., Asther M., Sigoillot J.-C. et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications // *J. Appl. Microbiol.* — 2006. — Vol. 100, № 2. — P. 219–232.
2. Espin J. C., Soler-Rivas C., Cantos E. et al. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst // *J. Agric. Food.* — 2001. — Vol. 49, № 3. — P. 1187–1193.
3. Seetharam G., Saville B.A. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite // *Enzym. Microb. Technol.* — 2002. — Vol. 31, № 6. — P. 747–753.
4. Freire R. S., Durbna N., Kubota L. T. Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices // *J. Braz. Chem. Soc.* — 2002. — Vol. 13, № 4. — P. 456–462.

5. Ikehata K., Nicell J. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols // *Biotechnol. Prog.* — 2000. — Vol. 16, № 4. — P. 533–540.
6. Wada S., Ichikawa H., Tsumi K. Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant // *Biotechnol. Bioeng.* — 1995. — Vol. 45, № 4. — P. 304–309.
7. Пат. 2 956929 США, МКИ 195-68 / Е. М. Cohen, L. L. Lerner. — Опубл. 18.10.1960.
8. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* — 1972. — Vol. 48, № 1. — P. 422–427.
9. Stark G.R., Dawson C.R. Spectrophotometric microdetermination of copper in copper oxidases using oxalyldihydrazide // *Analytical Chemistry.* — 1958. — Vol. 30, № 2. — P. 191–194.
10. Patra H., Mishra D. Pyrophosphatase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during leaf development and senescence // *Plant Physiol.* — 1979. — Vol. 63, № 1. — P. 318–323.
11. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1975. — 360 с.
12. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 430 с.
13. Романовська І. І., Осійчук О. В., Шестеренко Ю. А., Севастьянов О. В. Ферментативні методи елімінації фенольних полютантів // *Мікробіологія та біотехнологія* — 2008. — № 1(2). — С. 72–78.
14. Dec J., Bollag J.-M. Effect of various factors on dehalogenation of chlorinated phenols and anilines during oxidative coupling // *Environment. Sci. and Technol.* — 1995. — Vol. 29. — P. 657–663.

О. В. Севастьянов

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна

ВЛАСТИВОСТІ ТИРОЗИНАЗИ ГРИБІВ *AGARICUS BISPORUS* І ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ЕЛІМІНУВАННЯ ХЛОРЗАМІЩЕНИХ ФЕНОЛІВ

Резюме

З грибів *Agaricus bisporus* виділений частково очищений препарат тирозинази з збільшеною в 3 рази питомою фенолоксидазною активністю (13 мкмоль пурпурогаліну/ мг білка·хв, 500 од/мг білка·хв, відповідно, за пірогалолом і тирозином), з виходом білка 0,67 мг/г грибів, вмістом міді 0,19 %, рН-оптимумом 6,5, термооптимумом 40 °С). Методами SDS- і нативного електрофорезу в ПААГ досліджені фракційний склад і ферментативна активність білкових фракцій препарату. Виділений фермент каталізував процес окиснення хлорпохідних фенолу із ступенем конверсії 50–100 %, що залежить від числа замісників і їх розташування в фенольному ядрі; вперше для елімінування продуктів трансформації були застосовані алюмокалієві і алюмоамонійні галуни.

Ключові слова: тирозиназа, *Agaricus bisporus*, виділення, властивості, видалення хлорфенолів.

O. V. Sevastyanov

A.V. Bogatsky's Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine,
Lyustdorfskaya dor. 86, Odessa, 65080, Ukraine.

**PROPERTIES OF MUSHROOM AGARICUS BISPORUS TYROSINASE
AND IT'S USAGE FOR CHLOROSUBSTITUTED PHENOLS
ELIMINATION**

Summary

From mushrooms *Agaricus bisporus* was isolated partially purified tyrosinase preparation with 3-fold increased specific phenoloxidase activity (13 μmol purpurogallin/mg of protein·min, 500 U/mg of protein·min, respectively, for pyrogallol and tyrosine, with protein yield 0.67mg/ g of mushrooms, copper content 0,19 % , pH-optimum 6,5, thermooptimum 40°C). By the SDS- and native PAGE-electrophoresis method the fractional composition and enzymatic activity of protein fractions in preparation were studied. The isolated enzyme had catalyzed the process of phenol chloroderivatives oxydation with conversion degree of 50–100 % , depending from the substituents number and their position in phenolic nucleus; for the first time the potassium and ammonium alum were used for elimination of the transformation products.

Key words: tyrosinase, *Agaricus bisporus*, isolation, properties, chlorophenols removal