

УДК 577.151.45 + 542.943 : 547.56

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ОКСИДАЗНОЙ И ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ТВЕРДОФАЗНОЙ КУЛЬТУРЫ *PLEUROTUS OSTREATUS* НК-35

© Е.М. Кравченко*, С.И. Демченко, И.Д. Одарюк

Донецкий государственный университет, ул. Университетская, 24,
Донецк, 283001, Россия, elena_kravchenko1994@mail.ru

Цель работы – разработка методики определения лакказной и пероксидазной активности грибных и растительных экстрактов. Для подбора оптимальных условий и получения кинетических данных процесса окисления субстратов-маркеров с помощью спектрофотометрического и хемилюминесцентного методов использовали модельные ферменты – лакказу из *Trametes versicolor* (Трутовика разноцветного) и пероксидазу из *Armoracia rusticana* (Хрена обыкновенного). Апробацию разработанного подхода при определении лакказной и пероксидазной активности проводили на белковой смеси, выделенной из водного экстракта мицелиально-субстратного комплекса *Pleurotus ostreatus* (Вёшенки обыкновенной) НК-35.

Использование субстратов-маркеров разной природы (гетероциклических соединений, ароматических аминов, фенолов) повышает надежность определения активности с учетом различной субстратной специфиичности ферментов природных объектов. Применение хемилюминесцентного метода для анализа ферментативной активности позволяет работать с мутными и интенсивно окрашенными пробами, затрудняющими спектрофотометрию. В отличие от традиционных методик на основе люминол-зависимой хемилюминесценции в присутствии пероксидазы в работе исследовалось свечение, возникающее при окислении многоатомных фенолов.

Все использованные субстраты, за исключением фенола, окисляются в присутствии внеклеточных ферментов *P. ostreatus* НК-35, однако их активность по сравнению с модельными очень мала. Окисление флороглюцина в присутствии внеклеточных ферментов *P. ostreatus* НК-35, так же, как и в присутствии модельных ферментов, сопровождается хемилюминесценцией.

Ключевые слова: лакказ, пероксидаза, спектрофотометрия, хемилюминесценция, Вёшенка обыкновенная.

Для цитирования: Кравченко Е.М., Демченко С.И., Одарюк И.Д. Комплексный подход при определении оксидазной и пероксидазной активности твердофазной культуры *Pleurotus ostreatus* НК-35 // Химия растительного сырья. 2025. №2. С. 300–310. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250215908>.

Введение

Основной экологической ролью дереворазрушающих макромицетов является биодеградация компонентов древесины, например, таких природных полимеров, как лигнин и целлюлоза. Экстрацеллюлярные пероксидазы и лакказы составляют важную часть лигнолитического комплекса дереворазрушающих грибов [1]. Широкая субстратная специфичность, высокая активность по отношению к веществам различной природы позволяет использовать их при решении целого ряда технологических задач. Например, при очистке воды, почвы и других сред от разнообразных ксенобиотиков [1–7], создании ферментных биосенсоров [8, 9], синтезе органических веществ и полимеров [10–13].

С практической точки зрения интерес представляет использование мицелия как продуцента необходимых ферментов. Различные штаммы *P. ostreatus* активно культивируются в пищевых целях, а продуктивность их мицелия устанавливают при использовании в качестве маркеров ферментов класса оксидоредуктаз и гидролаз [14–16]. Для поиска эффективных продуцентов, подбора условий их культивирования, а также способов извлечения, очистки и концентрирования ферментов необходимы методики определения активности ферментов на разных этапах работы с культуральными средами и их экстрактами. К таким методикам выдвигается ряд требований: экспрессность и простота, приемлемая селективность и точность измерений.

* Автор, с которым следует вести переписку.

Оксидазную и пероксидазную активность ферментных систем, выделенных из разных природных источников, как правило, оценивают по параметрам уравнения Михаэлиса-Ментен с использованием данных о превращении одного или двух модельных субстратов. В данной работе предлагается сравнивать окисительную эффективность ферментов из различных природных источников, применяя несколько субстратов разной химической природы и относительные параметры, определяемые из кинетических данных.

Экспериментальная часть

Подбор субстратов и оптимальных условий эксперимента проводили с использованием модельных, коммерчески доступных ферментов: лакказы из *Trametes versicolor* (трутовика разноцветного) (*Trametes versicolor*) и пероксидазы из *Armoracia rusticana* (Хрена обыкновенного), оба препарата фирмы «Sigma». Предложенная система определения активности была апробирована на ферментах, которые содержатся в водном экстракте мицелиально-субстратного комплекса *Pleurotus ostreatus* (Вёшенки обыкновенной) НК-35. Гибридный штамм НК-35 базидиального ксилотрофа был выделен в чистую культуру из зернового посевного мицелия фирмы «Sylvan» (Венгрия). Культура гриба поддерживается на скошенном картофельно-глюкозном агаре (КГА) [17] с добавлением опилок из тополя при температуре +4 °C.

Кинетику расходования субстратов и накопления продуктов регистрировали на спектрофотометре SPECORD S 300 UV-VIS. Реакцию проводили непосредственно в кварцевой кювете спектрофотометра с терmostатированием и перемешиванием реакционной смеси. Для исследования хемилуминесценции при ферментативном окислении пирогаллола и флороглюцина использовалась оригинальная хемилуминесцентная установка [18].

Модельные ферменты, лакказа из *Trametes versicolor* (TvL), пероксидаза из *A. rusticana* (HRP), а также субстрат – диаммонийная соль 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната), или ABTS, производителя Sigma-Aldrich, использовались без дополнительной очистки. Гидрохинон и пирогаллол очищали сублимацией; фенол – перегонкой; *o*-фенилендиамин – перекристаллизацией из воды, с применением активированного угля; *o*-дианизидин – переосаждением водой из 96% этанола; флороглюцин – перекристаллизацией из водно-спиртовой смеси. Чистоту полученных веществ подтверждали измерением температур плавления и спектрофотометрически. Исследования проводились в цитратном, фосфатном и карбонатном буферных растворах, приготовленных на бидистиллированной воде в соответствии со стандартными методиками [19]. Все рабочие растворы готовили также на бидистиллированной воде. Раствор H₂O₂ стандартизовали перманганатометрией.

Растворы субстратов использовали свежеприготовленные, за исключением ABTS, который хранили при 4 °C не более 2 недель, в течение которых вещество стабильно. Растворы модельных ферментов хранили не более недели при 4 °C или более долгое время в замороженном состоянии. В отдельных экспериментах показано, что несколько циклов заморозки-разморозки растворов модельных ферментов не влияют на их активность.

Для определения оксидазной и пероксидазной активности твердофазной культуры *P. ostreatus* НК-35 гриб культивировали на луге семян подсолнечника. Навески воздушно-сухой луги (10 г) помещали в колбы Эrlenмейера (объемом 250 мл), увлажняли 40 мл водопроводной воды, стерилизовали 1 ч при 1.0 атм. (по факту атм. давл + 0.6–0.8 атм.). Инокуляцию остывшего субстрата осуществляли семисуточным маточным мицелием *P. ostreatus*, выращенным на КГА в чашках Петри. Культивирование макромицета проводили в полной темноте при 26 °C в течение 15 суток до полного обрастаания субстрата мицелием.

Ферменты извлекали из 10 г питательного субстрата с мицелием путем настаивания в 100 мл дистиллированной воды при 4 °C в течение 1 ч с периодическим перемешиванием. В экстракт добавляли (NH₄)₂SO₄ до насыщения, выдерживали в течение 6–8 ч при 4 °C и отделяли осадок центрифугированием при 4000 об./мин. Осадок сушили на воздухе. Навеску высущенного осадка массой 0.0113 г растворяли в 3.0 мл бидистиллированной воды, полученный концентрат белка использовали для исследований. Реакционная смесь объемом 2.5 мл содержала 0.2 мл концентрата белка.

Результаты и обсуждение

Экстрацеллюлярные оксидазы и пероксидазы макромицетов, как правило, являются ферментами с низкой субстратной специфичностью, а их окисляющая способность сильно варьирует. Поэтому для

сравнения активности ферментов, продуцируемых мицелием макромицетов, предлагается использовать набор из нескольких субстратов, регистрируя кинетику их расходования или накопления продуктов и применения при анализе легкоопределяемые кинетические параметры.

В предварительных экспериментах на нескольких субстратах лакказы *Trametes versicolor* были определены ее температурный и pH-оптимумы. На основании полученных данных предлагается использовать буферные растворы с pH 4.6. Согласно [20], оптимальные значения pH для многих лакказ макромицетов находятся в пределах 2.2–7.0, следовательно, подобранное значение pH соответствует медиане данного интервала. Согласно той же работе, температурный оптимум варьирует при использовании различных субстратов лакказы в пределах 25–80 °C. Однако рабочее значение температуры, видимо, следует брать близкое к минимальному для данного интервала, чтобы максимально снизить эффект автоокисления, характерный для некоторых из предлагаемых субстратов. При окислении двухатомных фенолов в присутствии лакказы *Trametes versicolor* температурные оптимумы находятся в пределах 35–45 °C.

Температурная зависимость активности пероксидазы хрена имеет сложный, неклассический вид (рис. 1). При 35 °C скорость окисления ABTS практически не отличается от максимальной. В присутствии пероксидазы хрена pH-оптимумы окисления исследованных веществ варьируют в пределах от 3.6 для ABTS до 7.2 для гидрохинона (рис. 2). Однако в кислой среде скорость пероксидазного окисления всех исследованных субстратов достаточно высока и составляет не менее половины от максимальной. Состав буферного раствора (цитратный, фосфатный, ацетатный) при постоянном значении pH практически не влияет на скорость ферментативного процесса окисления как в случае лакказы *Trametes versicolor*, так и в случае пероксидазы хрена.

На основании проведенных исследований для тестирования оксидазной и пероксидазной активности предложены следующие условия: pH 4.6, 0.1 M цитратный буфер, температура 35 °C. В предложенных условиях оксидазная активность исследуемого экстракта мицелиально-субстратного комплекса, полученная при использовании в качестве субстрата ABTS, хоть и не максимальна, но не сильно отличается от экстремума.

Для работы с модельными ферментами и исследуемыми экстрактами были выбраны следующие субстраты: ABTS, о-фенилендиамин, о-дианизидин, фенол, гидрохинон, пирогаллол, флороглюцин. Включение в исследование флороглюцина и пирогаллола связано с наличием хемилюминесценции при их ферментативном окислении [21], что дает возможность применять вместе со спектрофотометрическим хемилюминесцентный метод для анализа оксидазной и пероксидазной активности. Некоторые из предложенных субстратов уже используется по отдельности для тестирования природных экстрактов на предмет лакказной и пероксидазной активности [22, 23]. Например, гидрохинон является классическим субстратом лакказ для лабораторного анализа [24], ABTS и о-дианизидин широко используются для определения пероксидазной и оксидазной активности [15, 25].

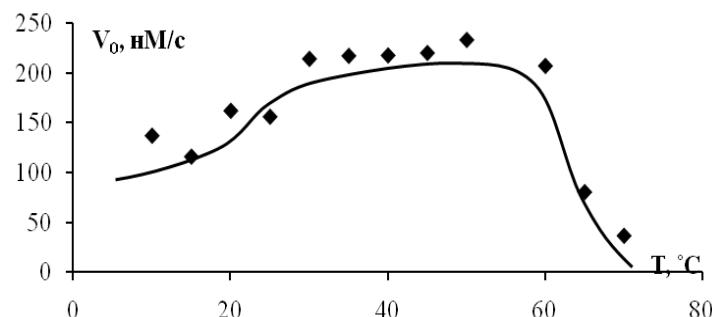


Рис. 1. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления ABTS от температуры. Цитратный буфер pH 3.6, $[ABTS]_0 = [H_2O_2]_0 = 32$ мкM, $[HRP]_0 = 0.1$ мг/л

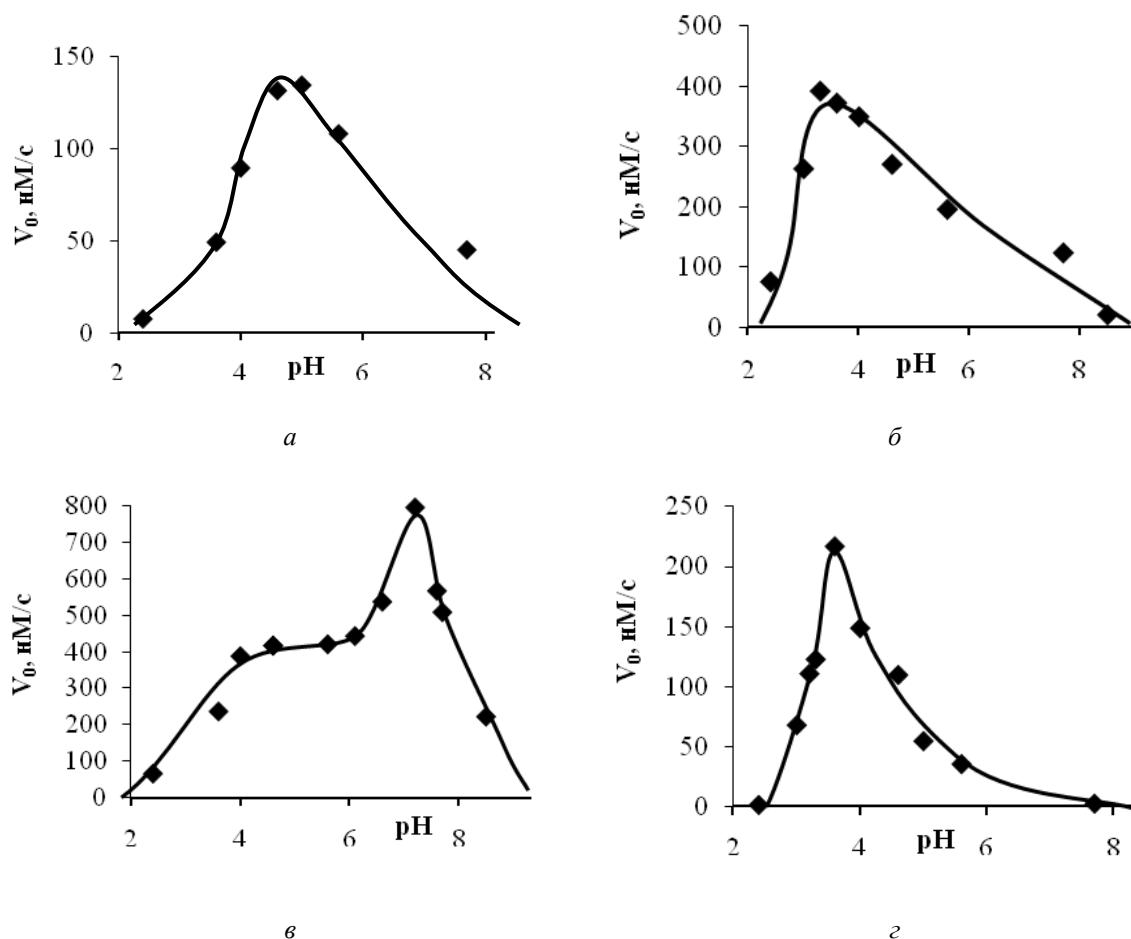


Рис. 2. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления субстратов от pH. T = 35 °C;
а) о-фенилендиамин; б) о-дианизидин; в) гидрохинон; г) ABTS

Для работы с модельными ферментами и исследуемыми экстрактами были выбраны следующие субстраты: ABTS, о-фенилендиамин, о-дианизидин, фенол, гидрохинон, пирогаллол, флороглюцин. Включение в исследование флороглюцина и пирогаллола связано с наличием хемилюминесценции при их ферментативном окислении [21], что дает возможность применять вместе со спектрофотометрическим хемилюминесцентный метод для анализа оксидазной и пероксидазной активности. Некоторые из предложенных субстратов уже используется по отдельности для тестирования природных экстрактов на предмет лакказной и пероксидазной активности [22, 23]. Например, гидрохинон является классическим субстратом лакказ для лабораторного анализа [24], ABTS и о-дианизидин широко используются для определения пероксидазной и оксидазной активности [15, 25].

Все указанные выше субстраты окисляются в присутствии исследуемых ферментов и сравнительно стабильны в их отсутствие – скорость неферментативного окисления как минимум на два порядка меньше скорости ферментативной реакции в условиях эксперимента. Первичные исследования проводили, используя в качестве субстрата ABTS. За реакцией можно достоверно следить как по кинетике расходования ABTS при $\lambda = 342$ нм, так и по накоплению ABTS^{•+}-радикала при $\lambda = 414$ нм. Второй вариант предпочтительнее, так как эта область спектрального диапазона не перекрывает с областью поглощения экстракта. Для катион-радикала коэффициент экстинкции устанавливали окислением исходного ABTS персульфатом калия до продукта одноэлектронного окисления [26] с дальнейшей стандартизацией раствора ABTS^{•+} с помощью аскорбиновой кислоты окислительно-восстановительным титрованием.

Исследование лакказной активности проводили при равновесной концентрации второго субстрата, молекулярного кислорода, которая при обычном атмосферном давлении составляет примерно 0.2 мМ.

Увеличение концентрации H₂O₂ при пероксидазном окислении ABTS, гидрохинона и о-дианизидина приводит к повышению начальной скорости, но лишь до некоторого предела. Для максимальной эффективности фермента необходимо использовать концентрацию H₂O₂, превышающую концентрацию субстратов в 1.5–2 раза. Высокие концентрации H₂O₂ использовать нецелесообразно, так как они ингибируют

пероксидазу [6]. Влияние концентрации окислителя на выход продукта для трех исследованных субстратов, ABTS, гидрохинона и *o*-дианизидина, сходно. Во всех трех случаях накоплению 1 моль продукта (или 0.5 моль бисазобифенила, 1 молекула которого образуется при окислении 2 молекул *o*-дианизидина) соответствует расходование 1 моль H_2O_2 .

Двухэлектронный механизм имеет место при окислении гидрохинона, который окисляется до сравнительно стабильного *n*-бензохинона [18], и *o*-дианизидина, первичным продуктом окисления которого является, по-видимому, соответствующий хинондиимин, рекомбинирующий в дальнейшем без окисления с образованием конечного продукта – бисазобифенила [27]. ABTS вследствие одноэлектронного окисления превращается в катион-радикал, который в условиях эксперимента стабилен. Продукт двухэлектронного окисления, дикатион [28], спектрофотометрически не зафиксирован. Кроме того, выход катион-радикала, вычисленный по значению оптической плотности, которое не меняется в конце реакции, близок к 100%.

Кинетические параметры, полученные при исследовании активности модельных ферментов по отношению к подобранным субстратам, представлены в таблице 1. Наибольшую ферментативную активность лакказа *Trametes versicolor* и пероксидаза хрена проявляют по отношению к ABTS, в связи с чем он взят в качестве внутреннего стандарта. Параметром, характеризующим активность фермента, было отношение начальной скорости окисления субстрата к начальной скорости окисления ABTS (табл. 1). Из-за большой разницы в активности модельных ферментов невозможно было проводить кинетические исследования при их одинаковых концентрациях. Поэтому для сравнения активности двух ферментов по отношению к одному и тому же субстрату была вычислена относительная активность:

$$A_{\text{отн}} = \frac{V_{0(HRP)}^{S_i} \cdot [E]_0(TvL)}{V_{0(TvL)}^{S_i} \cdot [E]_0(HRP)}, \quad (1)$$

где $[E]_0$ – молярные концентрации модельных ферментов.

Таким образом, по окислительной способности лакказа *Trametes versicolor* значительно уступает пероксидазе хрена, что характерно для всех исследованных субстратов.

В отдельных экспериментах показано, что при наличии обоих ферментов в реакционной смеси скорости лакказной и пероксидазной реакции аддитивны. Это, а также факт использования сравнительно высоких концентраций субстратов, позволяет определять лакказную и пероксидазную активность в одной реакционной смеси, инициируя пероксидазную реакцию в дополнение к лакказной введением раствора пероксида водорода.

Все исследованные вещества, за исключением фенола, достоверно окисляются в условиях эксперимента в присутствии концентрата белка. Наиболее активно оксидазным превращениям подвергается ABTS. Скорость окисления *o*-дианизидина меньше примерно в 3 раза, а остальных субстратов – на порядок, однако все еще достоверно фиксируется (табл. 2). Реакционная способность субстратов в реакции пероксидазного окисления в этой же системе иная. Так, с наибольшей скоростью окисляются *o*-фенилендиамин и *o*-дианизидин, а скорость превращения ABTS и остальных субстратов меньше. Вклад пероксидазной активности в суммарную скорость окисления субстратов изменяется от 7% для ABTS до 40–90% для остальных субстратов (табл. 2).

Таблица 1. Кинетические параметры процесса окисления субстратов в присутствии модельных ферментов

Субстрат	Tvl		HRP		$A_{\text{отн}}$
	$V_0(S)$, мкМ/с	$V_0(S)/V_0(\text{ABTS})$	$V_0(S)$, мкМ/с	$V_0(S)/V_0(\text{ABTS})$	
ABTS	(3.0±0.1)	1.00	(0.78±0.11)	1.00	17
<i>o</i> -дианизидин	(0.72±0.07)	0.24	(0.69±0.07)	0.88	63
<i>o</i> -фенилендиамин	(0.17±0.03)	0.056	(0.50±0.07)	0.65	193
фенол*	(0.012±0.001)	0.004	(0.05±0.01)	0.064	274
гидрохинон	(0.76±0.03)	0.25	(0.64±0.05)	0.82	55
пирогаллол	(0.65±0.10)	0.22	(0.27±0.02)	0.34	27
флороглюцин	(0.012±0.001)	0.004	(0.010±0.002)	0.013	55

Условия реакции: $[S]_0 = 200$ мкМ, $[H_2O_2]_0 = 200$ мкМ, $[Tvl]_0 = 10$ мг/л (231 U/л), $[HRP]_0 = 0.1$ мг/л (15.0 U/л). *Лакказное окисление фенола проводилось при $[Tvl]_0 = 150$ мг/л, в таблице приведено пересчитанное значение скорости.

Таблица 2. Кинетические параметры процесса окисления субстратов в присутствии концентратра белка

Субстрат	лакказная активность (ЛК)		пероксидазная активность (ПО)		$\frac{V_0(\text{ПО})}{V_0(\text{ПО}) + V_0(\text{ЛК})} \cdot 100\%$
	$V_0(S)$, нМ/с	$V_0(S)/V_0(\text{ABTS})$	$V_0(S)$, нМ/с	$V_0(S)/V_0(\text{ABTS})$	
ABTS	472	1.00	36	1.00	7%
<i>o</i> -Дианизидин	166	0.35	113	3.14	41%
<i>o</i> -Фенилендиамин	38	0.08	250	6.95	87%
Фенол	—	—	—	—	—
Гидрохинон	9.3	0.02	31	0.87	77%
Пирогаллол	40	0.09	78	2.16	66%
Флороглюцин	14	0.03	34	0.94	71%

Условия реакции: $[S]_0 = 200$ мкМ, $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 200$ мкМ, Т 35 °C, pH 4.6.

На примере реакции окисления ABTS термически денатурированный концентрат белка не проявляет ни оксидазной, ни пероксидазной активности. Этот факт, а также наличие температурного и pH-оптимумов (рис. 3), подтверждают, что окисление субстратов в присутствии концентратра белка связано именно с ферментативным катализом.

Температурный оптимум лакказы Вёшенки обыкновенной практически совпадает с условиями эксперимента (рис. 3б), в отличие от pH-оптимума (рис. 3а). Однако разница активностей при оптимальном pH и примененном в эксперименте отличается не сильно.

Зависимости начальной скорости накопления продуктов окисления ABTS и *o*-фенилендиамина от концентрации модельных лакказы и пероксидазы линейны. Используя уравнения линейной регрессии этих зависимостей, определили активность ферментов в международных единицах (табл. 3). Активность используемого препарата пероксидазы хрена по отношению к ABTS на порядок выше, чем активность препарата лакказы *Trametes versicolor*. Лакказная активность неочищенного осадка экстракта мицелиально-субстратного комплекса отличается от модельных ферментов примерно в 200 раз при определении скорости окисления двух субстратов, ABTS и ОФ. Пероксидазная активность исследуемого осадка сильно различается при использовании двух этих веществ, но в любом случае она ниже активности модельных ферментов в несколько тысяч раз.

Следует учитывать, что определение этих параметров проведено не в оптимальных для ферментов мицелиально-субстратного комплекса *P. ostreatus* НК-35 условиях, значения активности приведены к общей массе осадка, не очищенного от сульфата аммония, других низкомолекулярных веществ и балластных белков, а в качестве модельных ферментов использовались коммерческие препараты достаточно высокой степени очистки.

Лакказное окисление трехатомных и некоторых двухатомных фенолов сопровождается хемилюминесценцией [21]. Эмиттерами свечения являются соответствующие хиноны или их производные, образующиеся в электронно-возбужденном состоянии в актах рекомбинации радикалов, видимо, выходящих из активного центра фермента или образующихся за его пределами неферментативно. Интенсивность хемилюминесцентного свечения возрастает с концентрацией ферментов (рис. 4), что можно использовать для оценки содержания фермента в природном объекте.

Как известно из литературных данных, пероксидазное окисление многоатомных фенолов также сопровождается хемилюминесценцией [29]. В наших экспериментах при окислении в присутствии пероксидазы хрена трехатомных фенолов тоже отмечено это явление.

Показано, что пирогаллол и флороглюцин окисляются с образованием окрашенных продуктов в присутствии водного экстракта мицелиально-субстратного комплекса *P. ostreatus* НК-35, а добавление к реакционной смеси пероксида водорода увеличивает скорость процесса. Было целесообразно проверить наличие хемилюминесценции в этом процессе. Как выяснилось, введение концентратра белка в реакционную смесь, содержащую флороглюцин, при условиях, оптимальных для ферментативной активности, приводит к моментальному возрастанию интенсивности свечения (рис. 5, кривая 1). Если в системе содержится пероксид водорода, интенсивность свечения примерно вдвое больше (рис. 5, кривая 2). В обоих случаях свечение очень кратковременно, но его интенсивность значительно превышает темновой ток (рис. 5).

При введении термически денатурированного концентратра белка к реакционной смеси, содержащей флороглюцин, без и в присутствии H_2O_2 , хемилюминесценция отсутствует. В отдельных экспериментах показано, что введение H_2O_2 не влияет на интенсивность свечения при окислении флороглюцина в

присутствии лакказы *Trametes versicolor*. Следовательно, хемилюминесценция в присутствии концентратса белка связана именно с лакказным и пероксидазным окислением флороглюцина.

При окислении пирогаллола в присутствии концентратса белка свечение не зафиксировано, в том числе и при введении H_2O_2 .

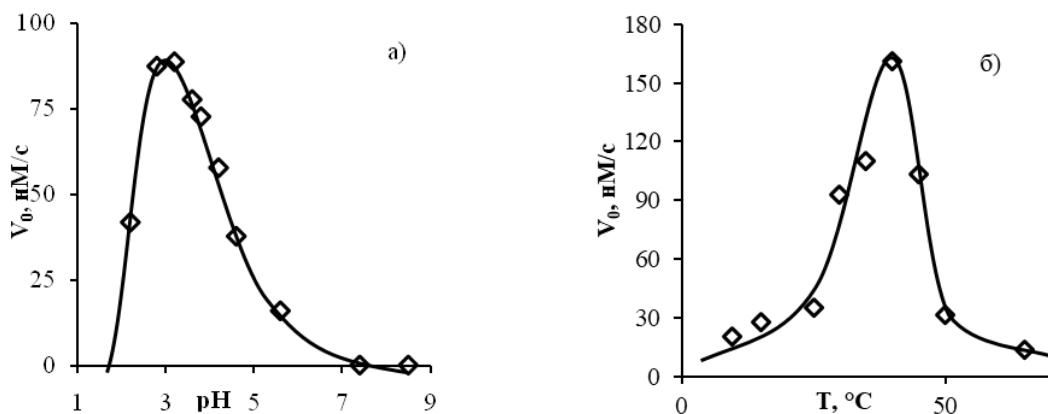


Рис. 3. Зависимость начальной скорости оксидазного окисления ABTS в присутствии водного экстракта мицелиально-субстратного комплекса *P. ostreatus* HK-35 а) от pH среды, $[ABTS]_0 = 30 \text{ мкМ}, 35^\circ\text{C}$; б) от температуры, $[ABTS]_0 = 30 \text{ мкМ}, \text{pH } 3.2$

Таблица 3. Активность модельных ферментов и ферментов биообъекта

Фермент	Условия определения	Активность, $\text{U}/\text{мг}$
Модельные ферменты		
Лакказа <i>Trametes versicolor</i>	Цитратный буфер pH 4.6, 35 °C, $[ABTS]_0 = 0.5 \text{ мМ}$	24.3
	Цитратный буфер pH 4.6, 35 °C, $[ABTS]_0 = 0.2 \text{ мМ}$	18.3
	Цитратный буфер pH 4.6, 35 °C, $[\text{ОФ}]_0 = 0.2 \text{ мМ}$	1.4
Пероксидаза хрена	Цитратный буфер pH 4.6, 35 °C, $[ABTS]_0 = 0.5 \text{ мМ}, [H_2O_2]_0 = 0.5 \text{ мМ}$	710
	Цитратный буфер pH 4.6, 35 °C, $[ABTS]_0 = 0.2 \text{ мМ}, [H_2O_2]_0 = 0.2 \text{ мМ}$	469
	Цитратный буфер pH 4.6, 35 °C, $[\text{ОФ}]_0 = 0.2 \text{ мМ}, [H_2O_2]_0 = 0.2 \text{ мМ}$	155
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -осадок водного экстракта мицелиально-субстратного комплекса <i>P. ostreatus</i> HK-35		
оксидазная активность	Цитратный буфер pH 4.6, 35 °C, $[ABTS]_0 = 0.2 \text{ мМ}$	0.094
	Цитратный буфер pH 4.6, 35 °C, $[\text{ОФ}]_0 = 0.2 \text{ мМ}$	0.008
пероксидазная активность	Цитратный буфер pH 4.6, 35 °C, $[ABTS]_0 = 0.2 \text{ мМ}, [H_2O_2]_0 = 0.2 \text{ мМ}$	0.007
	Цитратный буфер pH 4.6, 35 °C, $[\text{ОФ}]_0 = 0.2 \text{ мМ}, [H_2O_2]_0 = 0.2 \text{ мМ}$	0.051

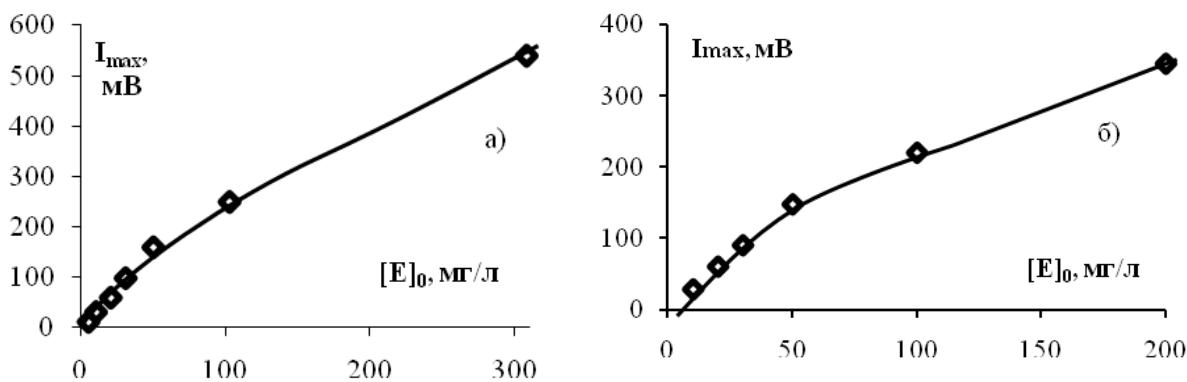


Рис. 4. Зависимость максимальной интенсивности хемилюминесценции от концентрации фермента в реакции лакказного окисления многоатомных фенолов. а) флороглюцин, $[S]_0 = 0.1 \text{ мМ}$; б) пирогаллол, $[S]_0 = 0.5 \text{ мМ}$

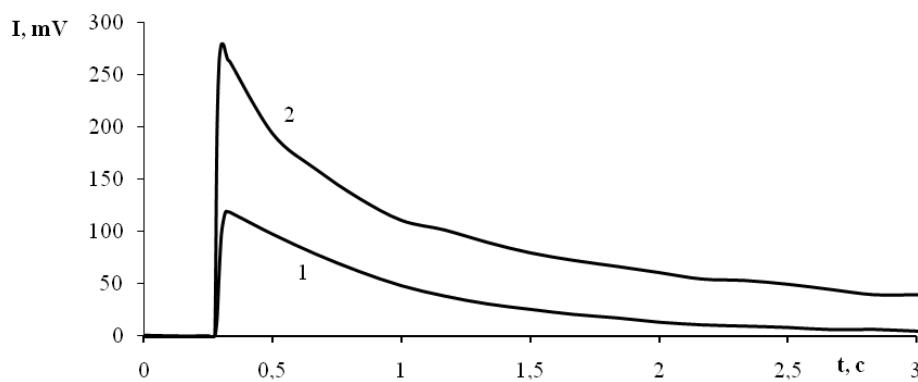


Рис. 5. Кинетические кривые хемилюминесценции в реакции окисления флуороглюцина в присутствии концентратов белка. Цитратный буфер pH 4.6; 35 °C, $[флуороглюцина]_0 = 200 \text{ мкМ}$. 1 – без H_2O_2 ; 2 – $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 200 \text{ мкМ}$

Наличие хемилюминесценции при окислении флуороглюцина в присутствии концентратов белка позволяет использовать для определения ферментативной активности дополнительный метод исследования, который может быть эффективен, например, при работе с пробами с высокой мутностью и оптической плотностью, спектрофотометрическое исследование которых затруднено.

Несмотря на то, что спектрофотометрическим данным окисление пирогаллола в присутствии концентратов белка происходит с достаточно высокой скоростью, хемилюминесценция при этом не наблюдается. Тот факт, что окисление пирогаллола в присутствии модельных ферментов сопровождается свечением, а в присутствии концентратов белка – нет, может объясняться различиями в механизмах превращения субстратов.

Выходы

Предложена система оптимальных условий для определения активности лакказ и пероксидаз с использованием в качестве субстратов коммерчески доступных веществ: ABTS, о-фенилендиамина, о-дианизидина, гидрохинона, пирогаллола, флуороглюцина и фенола. Система апробирована при определении активности ферментов мицелиально-субстратного комплекса *P. ostreatus* НК-35. Водный экстракт этого мицелиально-субстратного комплекса проявляет лакказную и пероксидазную активность. Она сравнительно низкая, но характеризуется широкой субстратной специфичностью. Сульфат аммония высаливает белки из водного экстракта этого мицелия с сохранением ферментативной активности, но полученный препарат нуждается в дальнейшей очистке.

Обнаружена хемилюминесценция при лакказном и пероксидазном окислении флуороглюцина ферментами мицелия Вёшенки обыкновенной НК-35. Показана возможность использования этого экспериментального факта для определения ферментативной активности.

Финансирование

Работа выполнена в рамках выполнения темы государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (номер госрегистрации 124012400355-7).

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Sugathan S., Pradeep N.S., Abdulhameed S. Bioresources and Bioprocess in Biotechnology. Vol. 2: Exploring Potential Biomolecules. Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2017. 442 p. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4284-3>.

2. Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K.H., Cavaco-Paulo A., Gübitz G.M. Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta* // Applied and Environmental Microbiology. 2000. Vol. 66 (8). Pp. 3357–3362. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3357-3362.2000>.
3. Grandclément C., Seyssiecq I., Piram A., Wong-Wah-Chung P., Vanot G., Tiliacos N., Roche N., Doumenq P. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review // Water Research. 2017. Vol. 111. Pp. 297–317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.005>.
4. Qian L., Chen B. Enhanced oxidation of benzo[a]pyrene by crude enzyme extracts produced during interspecific fungal interaction of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium* // Journal of Environmental Sciences. 2012. Vol. 24 (9). Pp. 1639–1646. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(11\)61056-5](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(11)61056-5).
5. Sukan A., Sargin S. Enzymatic Removal of Phenol from Industrial Wastewaters // Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology. 2013. Vol. 4. Pp. 300–307. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2013.43038>.
6. Куликова Н.А., Кляин О.И., Степанова Е.В., Королева О.В. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. С. 619–634.
7. Arregui L., Ayala M., Gómez-Gil X., Gutiérrez-Soto G., Hernández-Luna C. E., Herrera de Los Santos M., Levin L., Rojo-Domínguez A., Romero-Martínez D., Saparrat M.C.N., Trujillo-Roldán M.A., Valdez-Cruz N.A. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation // Microb. Cell Fact. 2019. Vol. 18. 200. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>.
8. Rodríguez M., Aleman G., Rodriguez-Delgado J., Dieck-Assad G., Martinez-Chapa S.O., Barceló D., Parra R. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds // Trends in Analytical Chemistry. 2015. Vol. 74. Pp. 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>.
9. Kyomuhimbo H.D., Brink H.G. Applications and immobilization strategies of the copper-centred laccase enzyme; a review // Heliyon. 2023. Vol. 9, no. 2. e13156. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13156>.
10. Отрохов Г.В., Морозова О.В., Васильева И.С., Шумакович Г.П., Зайцева Е.А., Хлупова М.Е., Ярополов А.И. Биокатализитический синтез электропроводящих полимеров и перспективы его использования // Успехи биологической химии. 2013. Т. 53. С. 355–386.
11. Mate D.M., Alcalde M. Laccase engineering: from rational design to directed evolution // Biotechnology Advances. 2015. Vol. 33(1). Pp. 25–40. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.007>.
12. Veda V.P. Awasthi M., Singh S., Tiwari S., Dwivedi U.N. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases // Biochemistry and Analytical Biochemistry. 2017. Vol. 6, no. 1. Pp. 1–16. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>.
13. Brugnari T., Braga D.M., dos Santos C.S.A., Torres B.H.C., Modkovski T.A., Haminiuk C.W.I., Maciel G.M. Laccases as green and versatile biocatalysts: from lab to enzyme market – an overview // Bioresour. Bioprocess. 2021. Vol. 8. 131. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00484-1>.
14. Анненков Б.Г., Азарова В.А. Коллекция штаммов вёшенки обыкновенной, их оценка и использование в грибоводстве // Дальневосточный аграрный вестник. 2009. Т. 1(9). С. 22–28.
15. Patel H., Gupte S., Gahlaut M., Gupte A. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1 // 3 Biotech. 2014. Vol. 4 (1). Pp. 77–84. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0129-1>.
16. El-Batal A.I., ElKenawy N.M., Yassin A.S., Amin M.A. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles // Biotechnology Reports. 2015. Vol. 5. Pp. 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.11.001>.
17. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: справочник. М., 1990. 240 с.
18. Шендрек А.Н., Каниболоцкая Л.В., Одарюк И.Д., Безнос В.В. Окисление фенольных антиоксидантов кислородом в водных средах // Украинский химический журнал. 2009. Т. 75, №12. С. 90–96.
19. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М., 1991. 543 с.
20. Potti R.B., Pinnamaneni R., Koono S. Occurrences, Physical and Biochemical Properties of Laccase // Universal Journal of Environmental Research and Technology. 2012. Vol. 2. Pp. 1–13.
21. Кравченко Е.М., Одарюк И.Д. Особенности механизма ферментативного окисления многоатомных фенолов молекулярным кислородом // Вестник Новгородского государственного университета. 2017. №5(103). С. 65–71.
22. Baldrian P. Fungal laccases – occurrence and properties // FEMS Microbiology Reviews. 2006. Vol. 30. Pp. 215–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>.
23. Yaropolov A.I., Skorobogatko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeyev S.D. Laccase: Properties, Catalytic Mechanism, and Applicability // Applied Biochemistry and Biotechnology. 1994. Vol. 49. Pp. 257–280. <https://doi.org/10.1007/BF02783061>.
24. Yuan X., Tian G., Zhao Y., Zhao L., Wang H., Bun Ng T. Biochemical Characteristics of Three Laccase Isoforms from the Basidiomycete *Pleurotus nebrodensis* // Molecules. 2016. Vol. 21(2). Pp. 203–218. <https://doi.org/10.3390/molecules21020203>.
25. Pelaez F., Martinez M.J., Martinez A.T. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation // Mycological Research. 1995. Vol. 99 (1). Pp. 37–42. [https://doi.org/10.1016/s0953-7562\(09\)80313-4](https://doi.org/10.1016/s0953-7562(09)80313-4).
26. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // Free Radical Biology & Medicine. 1999. Vol. 26. Pp. 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).

27. Кирейко А.В., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. Механизм реакций пероксидазного окисления о-диазидина, 3,3',5,5'-тетраметилбензидина и о-фенилендиамина в присутствии додецилсульфата натрия // Биоорганическая химия. 2006. Т. 32, №1. С. 80–86.
28. Branchi B., Galli C., Gentili P. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox // Org. Biomol. Chem. 2005. Vol. 3. Pp. 2604–2614. <https://doi.org/10.1039/B504199F>.
29. Halmann M., Velan B., Sery T., Schupper H. Peroxidase mediated chemiluminescence chemical parameters and uses in biological assays with phenol derivatives. Physicochemical parameters and uses in biological assays // Photochemistry and Photobiology. 1979. Vol. 30. Pp. 165–167. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07130.x>.

Поступила в редакцию 4 октября 2024 г.

После переработки 22 октября 2024 г.

Принята к публикации 2 декабря 2024 г.

Kravchenko Ye.M., Demchenko S.I., Odaryuk I.D. A COMPLEX APPROACH TO THE ASSAY OF OXIDASE AND PEROXIDASE ACTIVITY OF THE SOLID-STATE CULTURE OF PLEUROTUS OSTREATUS HK-35*

Donetsk State University, Universitetskaya st., 24, Donetsk, 283001, Russia, elena_kravchenko1994@mail.ru

The aim of this work is to develop the method to assay activity of laccase and peroxidase in plant and fungal extracts. We use laccase from *Trametes versicolor* and peroxidase from *Armoracia rusticana* as model enzymes to select the optimal conditions and to get the kinetic data by spectrophotometrical method. The approach was tested on assay the laccase and peroxidase activity in protein precipitate, isolated from aqueous extract of mycelial-sybrstrate complex (solid-state culture) of *Pleurotus ostreatus*, strain HK-35.

Meaning the different substrate specificity of isoenzymes in natural objects, use the different types of substrates (heterocyclic compounds, aromatic amines, phenols) improves reability of activity assay. Application of chemiluminescence to assay the enzymatic activity allows to work with mucous and highly colored samples, when spectrophotometry is difficult. In contrast to traditional luminol-dependend chemiluminescent methods to peroxidase activity assay, the current study discover luminescence by oxidation the polyhidric phenols without activators.

All used substrates except the phenol oxidise in presence of extracellular enzymes of strain HK-35, *P. ostreatus*. During oxidation of floroglucinol by these enzymes, as well as model enzymes take place chemiluminescence.

Keywords: laccase, peroxidase, spectrophotometry, chemiluminescence, *Pleurotus ostreatus*.

For citing: Kravchenko Ye.M., Demchenko S.I., Odaryuk I.D. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2025, no. 2, pp. 300–310. (in Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250215908>.

References

1. Sugathan S., Pradeep N.S., Abdulhameed S. *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology. Vol. 2: Exploring Potential Biomolecules*. Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2017, 442 p. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4284-3>.
2. Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K.H., Cavaco-Paulo A., Gübitz G.M. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66 (8), pp. 3357–3362. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3357-3362.2000>.
3. Grandclément C., Seyssiecq I., Piram A., Wong-Wah-Chung P., Vanot G., Tiliacos N., Roche N., Doumenq P. *Water Research*, 2017, vol. 111, pp. 297–317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.005>.
4. Qian L., Chen B. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, vol. 24 (9), pp. 1639–1646. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(11\)61056-5](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(11)61056-5).
5. Sukan A., Sargin S. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2013, vol. 4, pp. 300–307. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2013.43038>.
6. Kulikova N.A., Klyayn O.I., Stepanova Ye.V., Koroleva O.V. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2011, vol. 47, pp. 619–634. (in Russ.).
7. Arregui L., Ayala M., Gómez-Gil X., Gutiérrez-Soto G., Hernández-Luna C. E., Herrera de Los Santos M., Levin L., Rojo-Domínguez A., Romero-Martínez D., Saparrat M.C.N., Trujillo-Roldán M.A., Valdez-Cruz N.A. *Microb. Cell Fact.*, 2019, vol. 18, 200. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>.
8. Rodríguez M., Aleman G., Rodriguez-Delgado J., Dieck-Assad G., Martinez-Chapa S.O., Barceló D., Parra R. *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, vol. 74, pp. 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>.
9. Kyomuhimbo H.D., Brink H.G. *Heliyon*, 2023, vol. 9, no. 2, e13156. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13156>.

* Corresponding author.

10. Otrkhov G.V., Morozova O.V., Vasil'yeva I.S., Shumakovich G.P., Zaytseva Ye.A., Khlupova M.Ye., Yaropolov A.I. *Uspekhi biologicheskoy khimii*, 2013, vol. 53, pp. 355–386. (in Russ.).
11. Mate D.M., Alcalde M. *Biotechnology Advances*, 2015, vol. 33(1), pp. 25–40. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.007>.
12. Veda V.P. Awasthi M., Singh S., Tiwari S., Dwivedi U.N. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 2017, vol. 6, no. 1, pp. 1–16. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>.
13. Brugnari T., Braga D.M., dos Santos C.S.A., Torres B.H.C., Modkovski T.A., Haminiuk C.W.I., Maciel G.M. *Biore-sour. Bioprocess.*, 2021, vol. 8, 131. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00484-1>.
14. Annenkov B.G., Azarova V.A. *Dal'nevostochnyy agrarnyy vestnik*, 2009, vol. 1(9), pp. 22–28. (in Russ.).
15. Patel H., Gupte S., Gahlout M., Gupte A. *3 Biotech.*, 2014, vol. 4 (1), pp. 77–84. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0129-1>.
16. El-Batal A.I., ElKenawy N.M., Yassin A.S., Amin M.A. *Biotechnology Reports*, 2015, vol. 5, pp. 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.11.001>.
17. Semenov S.M. *Laboratornyye sredy dlya aktinomitsetov i gribov: spravochnik*. [Laboratory environments for actinomycetes and fungi: reference book]. Moscow, 1990, 240 p. (in Russ.).
18. Shendrik A.N., Kanibolotskaya L.V., Odaryuk I.D., Beznos V.V. *Ukrainskiy khimicheskiy zhurnal*, 2009, vol. 75, no. 12, pp. 90–96. (in Russ.).
19. Doson R., Elliot D., Elliot U., Dzhons K. *Spravochnik biokhimika*. [Biochemist's Handbook]. Moscow, 1991, 543 p. (in Russ.).
20. Potti R.B., Pinnamaneni R., Konna S. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 2012, vol. 2, pp. 1–13.
21. Kravchenko Ye.M., Odaryuk I.D. *Vestnik Novgorodskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2017, no. 5(103), pp. 65–71. (in Russ.).
22. Baldrian P. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, vol. 30, pp. 215–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>.
23. Yaropolov A.I., Skorobogatko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeyev S.D. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1994, vol. 49, pp. 257–280. <https://doi.org/10.1007/BF02783061>.
24. Yuan X., Tian G., Zhao Y., Zhao L., Wang H., Bun Ng T. *Molecules*, 2016, vol. 21(2), pp. 203–218. <https://doi.org/10.3390/molecules21020203>.
25. Pelaez F., Martinez M.J., Martinez A.T. *Mycological Research*, 1995, vol. 99 (1), pp. 37–42. [https://doi.org/10.1016/s0953-7562\(09\)80313-4](https://doi.org/10.1016/s0953-7562(09)80313-4).
26. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, vol. 26, pp. 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).
27. Kireyko A.V., Veselova I.A., Shekhovtsova T.N. *Bioorganicheskaya khimiya*, 2006, vol. 32, no. 1, pp. 80–86. (in Russ.).
28. Branchi B., Galli C., Gentili P. *Org. Biomol. Chem.*, 2005, vol. 3, pp. 2604–2614. <https://doi.org/10.1039/B504199F>.
29. Halmann M., Velan B., Sery T., Schupper H. *Photochemistry and Photobiology*, 1979, vol. 30, pp. 165–167. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07130.x>.

Received October 4, 2024

Revised October 22, 2024

Accepted December 2, 2024

Сведения об авторах

Кравченко Елена Михайловна – младший научный сотрудник кафедры биохимии и органической химии, elena_kravchenko1994@mail.ru

Демченко Светлана Ивановна – кандидат биологических наук, доцент, заведующая кафедрой физиологии растений, доцент кафедры физиологии растений, s.demchenko@donnu.ru

Одарюк Иван Дмитриевич – кандидат химических наук, доцент кафедры биохимии и органической химии, odaryuk.iv@gmail.com

Information about authors

Kravchenko Elena Mikhailovna – Junior Researcher, Department of Biochemistry and Organic Chemistry, elena_kravchenko1994@mail.ru

Demchenko Svetlana Ivanovna – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Plant Physiology, Associate Professor of the Department of Plant Physiology, s.demchenko@donnu.ru

Odaryuk Ivan Dmitrievich – Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Organic Chemistry, odaryuk.iv@gmail.com