

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Biochemii

Jerzy ŁOBARZEWSKI

**Heterogenność peroksydazy indukowanej kwasem syringowym
z mycelium grzyba *Inonotus radiatus***

Гетерогенность пероксидазы, индуцированной сиригеновой кислотой с применением гриба *Inonotus radiatus*

Heterogeneity of Peroxidase Induced by Syringic Acid from the Mycelium
of *Inonotus radiatus* Fungus

We wcześniejszych badaniach własnych stwierdzono, że mączka z drewna bukowego wpływa stymulująco na aktywność peroksydazy w hodowli grzyba *Inonotus radiatus* (6, 7). Podobny efekt stymulujący zaobserwowano, gdy do hodowli tego grzyba dodano kwas syringowy lub inne metoksyfenole. Fenole te wpływają na zwiększenie aktywności egzoperoksydazy w filtracie po hodowli grzyba *Inonotus radiatus* (8).

W obecnie podjętych badaniach chodziło o wyjaśnienie efektu stymulacyjnego kwasu syringowego na wewnątrzkomórkową peroksydazę z mycelium grzyba *Inonotus radiatus* poprzez badania elektroforetyczne. Przyjmując, że peroksydaza z chrzanu jest jednym z najlepiej przebadanych enzymów, zwłaszcza pod kątem własności elektroforetycznych, postanowiono porównać własności elektroforetyczne peroksydazy grzybowej z peroksydazą z chrzanu (1, 3, 4, 10). Porównanie to wydało się tym bardziej celowe, że peroksydaza grzybowa nie była dotychczas przedmiotem badań elektroforetycznych.

MATERIAŁ I METODY

Do badań używano kultury grzyba *Inonotus radiatus* (Włóknouszek promienisty). Materiałem do doświadczeń porównawczych w czasie doświadczeń elektroforetycznych był preparat handlowy peroksydazy z chrzanu firmy Koch-Light.

Skrawki mycelium grzyba *Inonotus radiatus* szczepiono do kolb Erlenmayera zawierających po 100 ml sterylizowanej pożywki wg Lindeberga (8). Do każdego doświadczenia przygotowywano po 40 kolb Erlenmayera. Kultury grzybowe przechowywano w temperaturze pokojowej przez 2 tygodnie. Do 20 kolb dodawano następnie roztwór kwasu syringowego, tak aby stężenie końcowe tego fenolu wynosiło 2×10^{-4} M. Wpływ kwasu syringowego na aktywność peroksydazy w mycelium grzyba w kulturach zawierających kwas syringowy w stosunku do kontroli bez kwasu syringowego badano po 4 tygodniach wzrostu mycelium grzybowego. W tym celu peroksydazę izolowano z mycelium kultur grzyba *Inonotus radiatus* stymulowanych kwasem syringowym i nie stymulowanych, zachowując jednakowe warunki preparacji. Mycelium odsączano od pożywki, a następnie poddawano je wstępnemu rozdrobnieniu przez 10-krotne zamrażanie w temp. -70° i rozmrażanie. Tak przygotowaną grzybnię rozdrabniano mechanicznie w homogenizatorze Pottera przez 20 min. w chłodzie. Homogenat wirowano przy $2000 \times g$ przez 15 min. Osad odrzucano, a supernatant wysalano $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Wytrącony osad białka rozpuszczano w 20 ml H_2O i dializowano w chłodzie. W otrzymanych w ten sposób preparatach z indukowanych i nie indukowanych hodowli grzyba oznaczano aktywność peroksydazy metodą A u r a n d a i współprac. (9), zawartość białka metodą F o l i n a (5).

Preparaty peroksydazy przechowywano do dalszych doświadczeń w temp. -20° . Elektroforezę preparatów peroksydazy grzybowej i peroksydazy z chrzanu przeprowadzano przy użyciu techniki krążkowej na żelu poliakrylamidowym wg metody D a v i e s a (2). Używano 6% żel poliakrylamidowy. Do polimeryzacji żelu stosowano bufor boranowy o sile jonowej $\mu=0,32$ i pH 8,9. Do naczyń elektrodowych użyto buforu boranowego o pH 8,3 i sile jonowej 0,08 μ . Natężenie prądu 6 mA/rurkę. Napięcie 400 V. Czas elektroforezy 100 min., temp. 0° . Długość żelu 8,5 cm. Rozwijanie elektroferogramów prowadzono w kierunku anody. Do wywoływania elektroferogramów na aktywność peroksydazy stosowano kolejno 0,02% roztwór benzydyny w 0,1 M buforze octanowym pH 5,3 i 0,3 M roztwór H_2O_2 . Barwne pasma białka na elektroferogramach wywoływano 0,15% roztworem błękitu Coomasie w mieszaninie metanol: CH_3COOH :glicerol: H_2O w stosunku 16:2:1:23 obj./obj. przez 90 min. Elektroferogramy odbarwiano w mieszaninie metanol: CH_3COOH :gliceryna: H_2O w stosunku 8:2:1:29 obj.

WYNIKI I Dyskusja

Doświadczenia przy użyciu kwasu syringowego jako stymulatora peroksydazy wykazują, że ilość peroksydazy w mycelium wzrasta pod działaniem tego związku (tab. 1).

Podczas badania wpływu kwasu syringowego na aktywność peroksydazy w filtracie po hodowli grzyba *Inonotus radiatus* obserwowano z jednej strony stymulację aktywności peroksydazy, a z drugiej — spadek zawartości białka w pożywce (8). Na podstawie wyników przedstawionych w tab. 1 obserwuje się równoległy wzrost zarówno aktywności enzymu, jak i stymulację biosyntezy białka przebiegającą zgodnie ze wzrostem aktywności peroksydazy. Kwas syringowy wpływa również na wzrost suchej masy mycelium (tab. 2).

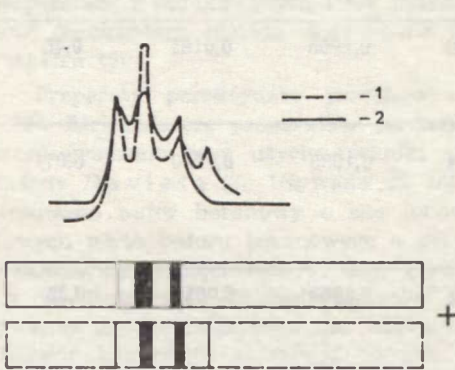
Tab. 1. Właściwości preparatu peroksydazy z hodowli grzyba indukowanej i nie indukowanej kwasem syringowym (stężenie $2 \times 10^{-4} \text{M}$)
 Properties of peroxidase preparation from the fungus culture induced and not induced by syringic acid (concentration of $2 \times 10^{-4} \text{M}$)

	Preparat enzymu Enzyme preparation	Objętość Volume ml	Jednostki aktywności Activity units	Suma jednostek aktywności Sum of activity units	Jednostki aktywności specyficznej Units of specific activity	Ileść białka Amount of protein γ/ml
Homogenat Homogenate	Nie indukowany Not induced	35	0,0033	0,1155	0,0275	0,12
	Indukowany Induced	35	0,0083	0,2905	0,0181	0,45
Po wysole- niu After preci- pitation (NH_4) ₂ SO_4 w (in) 100%	Nie indukowany Not induced	20	0,0084	0,1680	0,1200	0,07
	Indukowany Induced	20	0,0153	0,3060	0,0610	0,25

Tab. 2. Sucha masa mycelium (g) grzyba *Inonotus radiatus* indukowanego kwasem syringowym w porównaniu z kontrolą (kultury 4-tygodniowe)
 Dry weight (g) of *Inonotus radiatus* mycelium induced by syringic acid in comparison to control (4-week-old cultures)

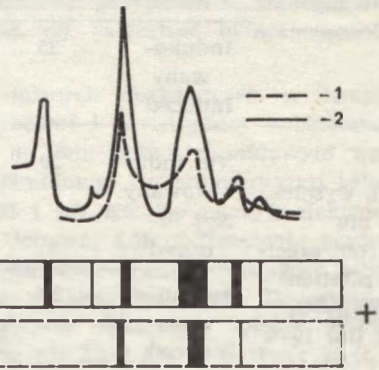
	Doświadczenie nr 1 Experiment No. 1	Doświadczenie nr 2 Experiment No. 2
Mycelium indukowane kwasem syringowym Mycelium induced by syringic acid	0,2527	0,2659
Mycelium nie indukowane kwasem syringowym Mycelium not induced by syringic acid	0,2314	0,2427
Przyrost suchej masy Increase of dry weight	0,0213	0,0237

Dalszym etapem pracy były doświadczenia elektroforetyczne. Przeprowadzono porównanie elektroferogramów preparatu peroksydazy grzybowej z mycelium indykowanego kwasem syryngowym z preparatem kontrolnym peroksydazy z nie indukowanego mycelium grzyba *Inonotus radiatus* (ryc. 1). Preparat peroksydazy z mycelium indukowanego posiadał wyższą aktywność od preparatu enzymu z mycelium nie indukowanego. Przez rozcieńczenie wyrównano aktywność obu roztworów peroksydazy. Preparat peroksydazy z mycelium kontrolnego wykazuje 3 izozymy. Peroksydaza z mycelium indukowanego kwasem syryngowym rozdzieliła się elektroforetycznie w identycznych warunkach na 4 izozymy (ryc. 1). Następnie porównano własności elektroforetyczne obu przygotowanych preparatów peroksydazy grzybowej z własnościami migracyjnymi peroksydazy z chrzanu. W tym celu przygotowano roztwór handlowego pre-



Ryc. 1. Izozymy peroksydazy z grzyba *Inonotus radiatus* rozdzielone przy pomocy elektroforezy na żelu poliakrylamidowym; 1 — preparat peroksydazy z hodowli indukowanej kwasem syryngowym w stężeniu 2×10^{-4} M, 2 — kontrola

Isozymes of *Inonotus radiatus* peroxidase, separated by electrophoresis on polyacrylamide gel; 1 — peroxidase preparation from the culture induced by 2×10^{-4} M syringic acid, 2 — control

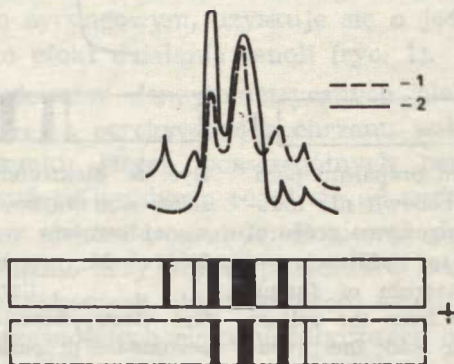


Ryc. 2. Izozymy peroksydazy z chrzanu i peroksydazy grzybowej rozdzielone elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym, 1 — preparat peroksydazy grzybowej z mycelium nie indukowanego kwasem syryngowym, 2 — preparat peroksydazy z chrzanu

Isozymes of horseradish and fungus peroxidases, separated electrophoretically on polyacrylamide gel; 1 — preparation of fungus peroxidase from the mycelium not induced by syringic acid, 2 — horseradish peroxidase

paratu peroksydazy z chrzanu o takiej samej aktywności jak preparaty peroksydaz grzybowych. Przeprowadzono rozdział i porównano własności elektroforetyczne tak przygotowanych roztworów peroksydaz. Peroksydaza z chrzanu rozdziela się na 6 frakcji. Frakcje I, II i VI peroksydazy chrzanowej, licząc od linii startu, nie znajdują odpowiedni-

ków na elektroferogramach roztworu peroksydazy grzybowej kontrolnej (ryc. 2). Natomiast w przypadku porównania własności elektroforetycznych peroksydazy chrzanowej z peroksydazą grzybową z mycelium indukowanego jedynie frakcja I i II (od linii startu) nie pokrywają się z położeniem frakcji peroksydazy grzybowej na elektroferogramie (ryc. 3).

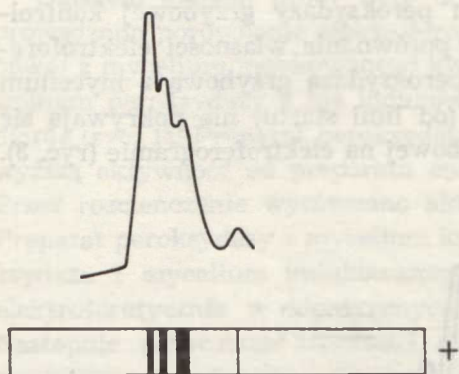


Ryc. 3. Izozymy peroksydazy z chrzanu i peroksydazy grzybowej rozdzielone elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym; 1 — preparat peroksydazy grzybowej z mycelium indukowanego kwasem syringowym w stężeniu 2×10^{-4} M, 2 — preparat peroksydazy z chrzanu

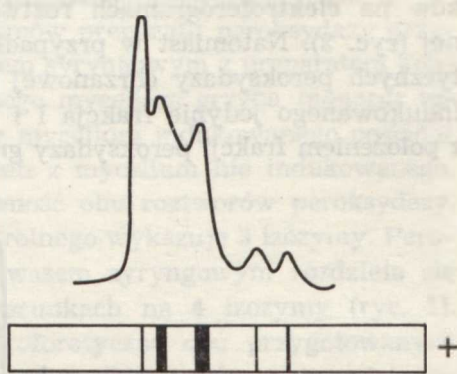
Isozymes of horseradish and fungus peroxidases, separated electrophoretically on polyacrilamide gel; 1 — preparation of fungus peroxidase from the mycelium induced by 2×10^{-4} M syringic acid, 2 — horseradish peroxidase

Zagęszczenie roztworów peroksydazy grzybowej przez liofilizację doprowadziło do zwiększenia ilości frakcji enzymatycznych na elektroferogramach. Efekt ten zależy bądź od progu czułości reakcji wywołującej pasma aktywności peroksydazowej na elektroferogramie (z benzydynam i H_2O_2) lub jest spowodowany oderwaniem się podjednostek peroksydazy podczas liofilizacji. Elektroferogram liofilizatu peroksydazy grzybowej nie indukowanej wykazuje 4 frakcje, a indukowanej 5 frakcji (ryc. 4, 5). W liofilizacie peroksydazy grzybowej nie indukowanej stwierdza się 8 frakcji białkowych, z których 4 odpowiadają frakcjom enzymatycznym peroksydazy (ryc. 6). Porównanie frakcji białkowych z frakcjami enzymatycznymi w preparacie peroksydazy indukowanej po liofilizacji przy pomocy elektroforezy wykazuje również różnicę 2 frakcji. Białko rozdziela się na 9 frakcji, 5 z tych frakcji odpowiada izozymom peroksydazy (ryc. 7).

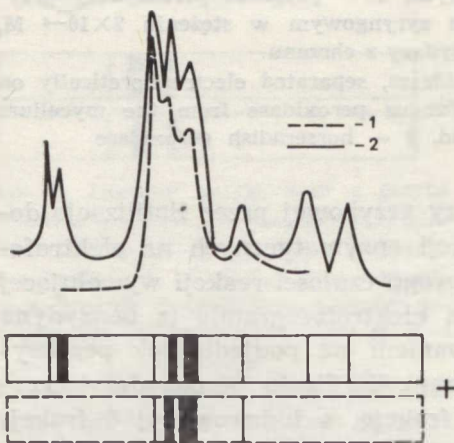
Przeprowadzone doświadczenia wskazują na możliwość stymulowania ilości frakcji o aktywności peroksydazy w mycelium grzyba *Inonotus radiatus* przy pomocy kwasu syringowego.



Ryc. 4. Elektroferogram preparatu peroksydazy grzybowej z hodowli nie indukowanej kwasem syryngowym; preparat zagęszczony przez liofilizację
Gel electrophoretic diagram of fungus peroxidase preparation from the culture not induced by syringic acid; the preparation dried by lyophilization

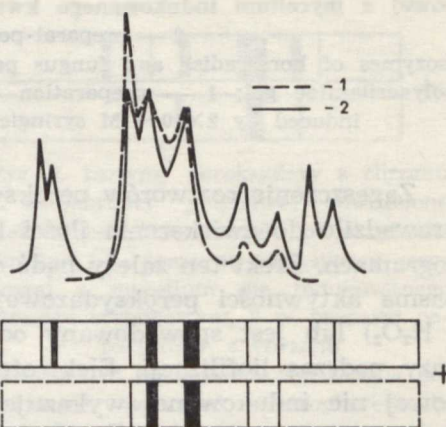


Ryc. 5. Elektroferogram preparatu peroksydazy grzybowej z hodowli indukowanej kwasem syryngowym w stężeniu 2×10^{-4} M; preparat zagęszczony przez liofilizację
Gel electrophoretic diagram of fungus peroxidase preparation from the culture induced by 2×10^{-4} M syringic acid; the preparation dried by lyophilization



Ryc. 6. Elektroferogram na żelu poliakrylamidowym; 1 — frakcje białkowe zawarte w preparacie peroksydazy grzybowej z hodowli nie indukowanej kwasem syryngowym, 2 — izozymy peroksydazy
Gel electrophoretic diagram; 1 — protein fractions of fungus peroxidase preparation from the culture not induced by syringic acid, 2 — peroxidase isozymes

Gel electrophoretic diagram; 1 — protein fractions of fungus peroxidase preparation from the culture not induced by syringic acid, 2 — peroxidase isozymes



Ryc. 7. Elektroferogram na żelu poliakrylamidowym; 1 — frakcje białkowe zawarte w preparacie peroksydazy grzybowej z hodowli indukowanej kwasem syryngowym w stężeniu 2×10^{-4} M, 2 — izozymy peroksydazy
Gel electrophoretic diagram; 1 — protein fraction of fungus peroxidase preparation from the culture induced by 2×10^{-4} M syringic acid, 2 — peroxidase isozymes

Gel electrophoretic diagram; 1 — protein fraction of fungus peroxidase preparation from the culture induced by 2×10^{-4} M syringic acid, 2 — peroxidase isozymes

Porównanie ilości frakcji enzymatycznych na żelu poliakrylamidowym wykonano niosząc na kolumnienki z żelazem jednakowe objętości preparatów peroksydazy grzybowej indukowanej i nie indukowanej, o jednakowej aktywności. Tak przeprowadzone doświadczenie pozwala na eliminację stymulującego działania kwasu syringowego na wzrost mycelium grzyba. Przy równych aktywnościach, naniesionych na elektroferogram preparatów enzymatycznych, indukowanych i nie indukowanych kwasem syringowym, uzyskuje się o jedną frakcję enzymatyczną więcej jako efekt działania fenoli (ryc. 1).

Porównanie wykresów denzytometrycznych elektroferogramów peroksydazy grzybowej z peroksydazą z chrzanu wskazuje na dość duże podobieństwo stosunku stężeń poszczególnych pasm obu peroksydaz (ryc. 2, 3). Peroksydaza grzybowa różni się od peroksydazy chrzanowej ilością prążków na elektroferogramie. Ponieważ doświadczenia porównawcze przeprowadzono przy użyciu preparatów peroksydazy grzybowej i chrzanowej o jednakowych aktywnościach, wydaje się więc, że uzyskane różnice we własnościach elektroforetycznych obu enzymów są różnicami gatunkowymi.

Profesorowi dr Jerzemu Trojanowskiemu wyrażam wdzięczność za cenne uwagi w trakcie pisania pracy.

PIŚMIENNICTWO

1. Chmielnicka J.: Elektroforetyczne i chromatograficzne rozdzielanie peroksydazy chrzanu. *Acta. Pol. Pharm.* **21**, 395—400 (1964).
2. Davies B. J.: Disc Electrophoresis II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**, 404—427 (1964).
3. Kay E., Leland M., Shannon, Lew J. Y.: Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots II Catalytic Properties. *J. Biol. Chem.* **242**, 2470—2473 (1967).
4. Klapper M. H., Hackett D. P.: Investigation on the Multiple Components of Commercial Horseradish Peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* **96**, 272—282 (1965).
5. Lowry O. H., Rosebrough N. S., Farr A. L., Randall R. J.: Protein Measurement with the Folin-phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275 (1951).
6. Łobarzewski J.: Stimulation of Peroxidase Activity in *Inonotus radiatus* and *Phellinus pini* Fungi. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* **25**, 15—21 (1970).
7. Łobarzewski J.: Isolation of Peroxidase from *Inonotus radiatus* Fungus. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* **26**, 35—43 (1971).
8. Łobarzewski J., Sikora A.: Wpływ fenoli na aktywność peroksydazy w hodowlach płynnych grzyba *Inonotus radiatus*. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* **27**, 87—98 (1972).
9. Methoden der enzymatischen Analyse. Red. Bergmeyer H. U., Verlag Chemie G.M.B.H., Weinheim 1962.

10. Shannon L. M., Kay E., Lew J. Y.: Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. I. Isolation and Physical Properties. *J. Biol. Chem.* **241**, 2166—2172 (1966).

РЕЗЮМЕ

Исследовали влияние сириговой кислоты на рост мицелия гриба *Inonotus radiatus*. Констатировали, что сириговая кислота увеличивает массу мицелия и содержание белка и положительно влияет на внутриклеточный биосинтез пероксидазы. Во время электрофореза на полиакриламидовом желе препарата пероксидазы из индуцированной сириговой кислотой культуры установлен распад на 4 изозима, в то время как в контрольном препарате наблюдается 3 изозима. Грибная пероксидаза по сравнению с пероксидазой из хрена имеет меньшее число изозимов.

SUMMARY

Investigations were carried out on the effect of syringic acid on the growth of *Inonotus radiatus* mycelium. It was found that syringic acid stimulates the mycelium mass and protein content. It has a positive effect on the biosynthesis of intracellular peroxidase. During the electrophoresis on polyacrylamide gel, of peroxidase preparation from the culture induced by syringic acid, separation into four isozymes was observed, whereas in the control preparation into three isozymes only. Fungus peroxidase shows a smaller number of isozymes in comparison to horseradish peroxidase.