ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA
VOL. XXIX, 3 SECTIO C 1974

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Biochemii

Jerzy ŁOBARZEWSKI

Oczyszczanie peroksydazy z mycelium grzyba *Inonotus radiatus*

Очищение пероксидазы от *mycelium* гриба *Inonotus radiatus*

The Purification of Peroxidase from the Mycelium of the *Inonotus radiatus* Fungus

WSTĘP

Peroksydaza występująca u grzybów rosnących na drzewach bierze udział w procesie rozkładu ligniny (5, 6, 7, 14, 20). Badania Ishikawy i współprac. (8, 9, 10, 11) nad peroksydazą grzybową dotyczą głównie udziału tego enzymu w rozkładzie modelowych monomerów lub dimerów ligniny.

Metodę izolacji peroksydazy z filtratu po hodowli grzyba *Inonotus radiatus* na sefadeksie G-100 podano we wcześniejszej pracy (16). Właściwości enzymu peroksydazy grzybowej są jeszcze mało poznane.

Przedmiotem niniejszej pracy jest opracowanie kilku nowych metod oczyszczania chromatograficznego peroksydazy z mycelium grzyba *Inonotus radiatus*.

METODY

Materiałem do badań było mycelium *Inonotus radiatus* (Sow. Ex. Fr. P. Karst H.M.I.P.C. nr 4335) hodowane na 3% brzeczce piwnej z dodatkiem 2% mączki z drewna bukowego w temp. 25° przez 3 tygodnie. Wstępnie homogenizowane mycelium zamrażano 10-krotnie w temp. —70° i rozmrażano. W trakcie tych operacji mycelium homogenizowano 2-krotnie. Homogenat odwirowano przy 10 000 × g przez 15 min. w chłodzie. Nadsącz używano do dalszej preparatyki peroksydazy. Aktywność peroksydazy wyliczano z różnicy pomiędzy zmianą absorpcji przy 480 nm, utlenionej enzymatycznie p-fenylenodwuaminy z dodatkiem H_2O_2 i bez dodatku H_2O_2 według metody Auranda i współprac. (1). Zawartość białka w preparatach enzymatycznych oznaczano metodą Lowry i współprac. (15), a fosforany —

metodą Fiskego i SubbaRowa (4). Elektroforezę na żelu poliakrylamidowym przeprowadzano według metody Daviesa (3). Położenie pasm enzymatycznych na elektroferogramach poznawano przy pomocy reakcji z H_2O_2 i benzydyną. Używano 0,02% roztwór benzydyny w 0,1 M buforze octanowym o $pH = 5,6$ i 0,3 M H_2O_2, zmieszane w stosunku 4 : 1 obj. Bruszyt ($CaHPO_4$) i hydroksyloapatyt ($Ca_3(PO_4)_5OH$) otrzymywano według metody Tiseliusa i współprac. (19).

WYNIKI

Peroksydazę izolowano wstępnie z ekstraktu z mycelium przy pomocy siarczanu amonu. Przy pierwszym strąceniu zastosowano 70% nasycenie $(NH_4)_2SO_4$ ekstraktu z grzybni. Po wytrąceniu osadu preparat wirowano przez 15 min. przy 10 000 × g w chłodzie. Nadsącz odrzucano, a osad rozpuszczano w niewielkiej objętości buforu fosforanowego 0,005 M, *pH* 7. W ten sposób zmniejszano objętość preparatu 3-krotnie. Następnie ponownie wysalano białko w preparacie grzybowym przy 100% nasyceniu siarczanem amonu. Wytrącony osad wirowano przez 15 min. przy 10 000 × g w chłodzie. Osad rozpuszczano w buforze fosforanowym 0,005 M,

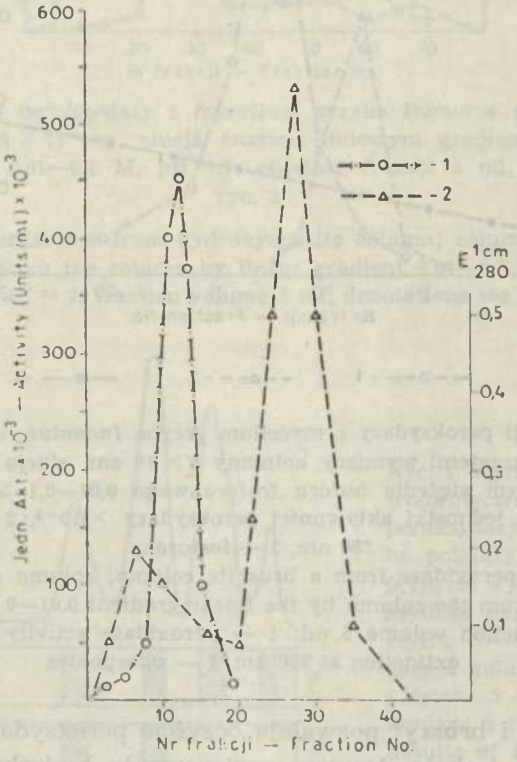
Tab. 1. Wstępne oczyszczanie peroksydazy z mycelium *Inonotus radiatus*
Purification of peroxidase from the mycelium of *Inonotus radiatus* fungus

Nazwa preparatu Name of preparation	Objętość Volume ml	Suma jednostek aktywności peroksydazy Sum of peroxidase units	Jednostki aktywności specyficznej Peroxidase specific units	Białko Protein mg/ml	Wielokrotność oczyszczenia Purification step
Homogenat Homogenate	450	67,5	0,68	0,22	—
Po wysoleniu 70% $(NH_4)_2SO_4$ 70% saturation with $(NH_4)_2SO_4$	150	29,25	1,60	0,12	2,3
Po wysoleniu 100% $(NH_4)_2SO_4$ 100% saturation with $(NH_4)_2SO_4$	45	11,70	2,00	0,13	3,0
Po ogrzaniu temp. 50°C, czas — 15 min. Heating (temp. 50°C, time 15 min.)	45	10,00	2,00	0,13	3,0

pH 7, a supernatant odrzucano. Rozpuszczony osad dializowano przez 24 godz. wobec buforu fosforanowego 0,005 M, *pH* 7. Otrzymany preparat peroksydazy ogrzewano w temp. 50° przez 15 min. w celu inaktywacji termicznej innych oksydaz (tab. 1).

Ten roztwór peroksydazy służył dalej do preparatywnego oczyszczania enzymu na kolumnach z Biogelu P, bruszytu i hydroksyapatytu

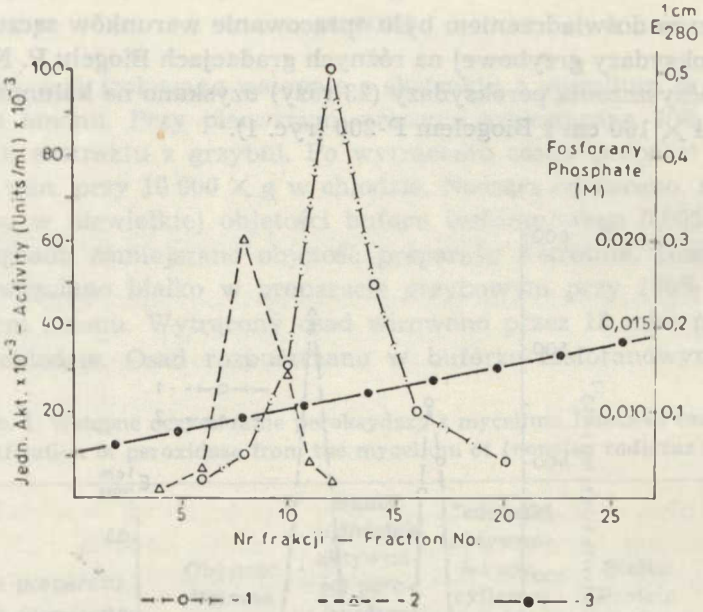
Pierwszym doświadczeniem było opracowanie warunków sączenia preparatu peroksydazy grzybowej na różnych gradacjach Biogelu P. Najlepsze rezultaty oczyszczenia peroksydazy (23 razy) uzyskano na kolumnie o wymiarach 1,4 × 100 cm z Biogelem P-200 (ryc. 1).



Ryc. 1. Profil elucji peroksydazy z mycelium grzyba *Inonotus radiatus* na kolumnie z Biogelem P-200; wymiary kolumny 1,4 × 100 cm; elucja buforem fosforanowym 0,005 M, *pH* = 7; objętość frakcji 5 ml; 1 — jednostki aktywności peroksydazy × 10^{-3}, 2 — ekstynkcja przy 280 nm

Elution profile of peroxidase from Biogel P-200 column; column size 1.4 × 100 cm; elution system: 0.005 M phosphate; fraction volume 5 ml; 1 — peroxidase activity units × 10^{-3}, 2 — extinction at 280 nm

Następnie przeprowadzono próby oczyszczania peroksydazy grzybowej na bruszycie ($CaHPO_4$). Używano kolumny o wymiarach 3 × 12 cm. Stosując gradient liniowy stężenia buforu fosforanowego o *pH* 5 uzyskano 20-krotne oczyszczenie peroksydazy (ryc. 2).

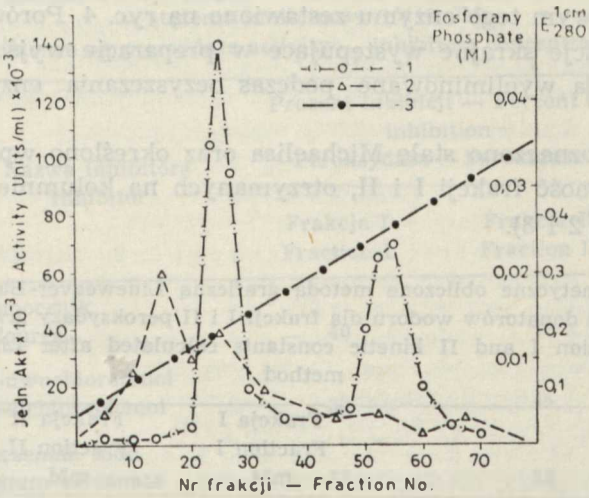


Ryc. 2. Profil elucji peroksydazy z mycelium grzyba *Inonotus radiatus* oczyszczonej na kolumnie z bruszytem; wymiary kolumny 3 × 10 cm; elucja enzymu z kolumny gradientem liniowym stężenia buforu fosforanwego 0,01—0,1 M, *pH* = 5; objętość frakcji 5 ml; 1 — jednostki aktywności peroksydazy × 10^{-3}, 2 — ekstynkcja przy 280 nm, 3 — fosforany

Elution profile of peroxidase from a brushite column; column size 3 × 10 cm; enzyme was eluted from the column by the linear gradient 0.01—0.1 M of a phosphate buffer *pH* = 5; fraction volume 5 ml; 1 — peroxidase activity units × 10^{-3}, 2 — extinction at 280 nm, 3 — phosphates

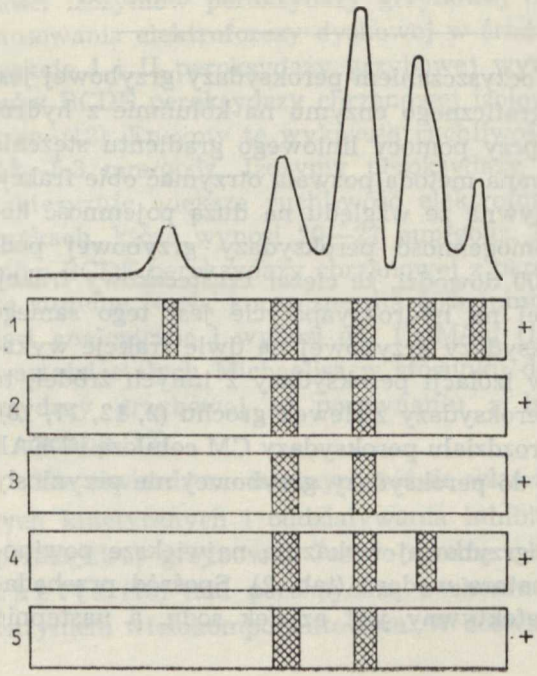
Biogel P-200 i bruszyt pozwalają oczyścić peroksydazę ok. 20-krotnie bez podziału na frakcje. Dopiero zastosowanie hydroksyapatytu doprowadziło do rozdzielenia badanego preparatu peroksydazy na dwie frakcje. Kolumna z hydroksyapatytu miała wymiary 3 × 11 cm. Zastosowano gradient liniowy stężenia buforu fosforanowego o *pH* 7 (ryc. 3). Aktywność frakcji I peroksydazy wzrasta 11-krotnie, a frakcji II — 88-krotnie.

Porównanie właściwości elektroforetycznych oczyszczonych na Biogelu P-200, bruszycie i hydroksyapatycie preparatów peroksydazy z prepa-



Ryc. 3. Profil elucji peroksydazy z mycelium grzyba *Inonotus radiatus*; kolumna z hydroksyapatytu 3 × 11 cm; elucja enzymu liniowym gradientem stężenia buforu fosforanowego 0,01—0,1 M, *pH* = 7; objętość frakcji 5 ml; oznaczenia patrz ryc. 2

Elution profile of peroxidase from hydroxyapatite column; column size 3 × 11 cm; enzyme was eluted from the column by linear gradient 0.01—0.1 M of a phosphate buffer; *pH* = 7; fraction volume 5 ml; denotations see Fig. 2



Ryc. 4. Wyniki rozdziału elektroforetycznego preparatów peroksydazy grzybowej na żelu poliakrylamidowym; 1 — preparat wyjściowy, 2 — peroksydaza oczyszczona na bruszycie, 4 — frakcja I peroksydazy z kolumny z hydroksyapatytem, 5 — frakcja II peroksydazy z tej samej kolumny Results of the electrophoretic separation of fungal peroxidase on polyacrylamide gel; 1 — initial preparation, 2 — peroxidase purfied on Biogel P-200, 3 — peroxidase purified on brushite, 4 — peroxidase fraction I from hydroxyapatite column, 5 — peroxidase fraction II from the same column

ratem wyjściowym tego enzymu zestawiono na ryc. 4. Porównanie to dowodzi, że frakcje skrajne występujące w preparacie wyjściowym peroksydazy zostają wyeliminowane podczas oczyszczania enzymu na kolumnach.

Następnie oznaczono stałe Michaelisa oraz określono wpływ inhibitorów na aktywność frakcji I i II, otrzymanych na kolumnie z hydroksyapatytem (tab. 2 i 3).

Tab. 2. Stałe kinetyczne obliczone metodą graficzną Lineweaver-Burk w stosunku do H_2O_2 i donatorów wodoru dla frakcji I i II peroksydazy grzybowej
Peroxidase fraction I and II kinetic constants calculated after Lineweaver-Burk method

	Frakcja I Fraction I mM	Frakcja II Fraction II mM
p-fenylenodwuamina p-phenylenediamine	24	16
Gwajakol Guaiacol	46	36
Pirogalol Pirogallol	5	4
Nadtlenek wodoru H_2O_2	6	3,2

Nowością w badaniach nad oczyszczaniem peroksydazy grzybowej jest moziiwość rozdziału chromatograficznego enzymu na kolumnie z hydroksyapatytem na dwie frakcje przy pomocy liniowego gradientu stężenia buforu fosforanowego. Opracowana metoda pozwala otrzymać obie frakcje peroksydazy na skalę preparatywną ze względu na dużą pojemność kolumny z hydroksyapatytu. Homogenność peroksydazy grzybowej podczas sączenia przez Biogel P-200 dowodzi, że ciężar cząsteczkowy frakcji I i II peroksydazy rozdzielonej na hydroksyapatycie jest tego samego rzędu. Uzyskany rozdział peroksydazy grzybowej na dwie frakcje wykazuje podobieństwo do wyników izolacji peroksydazy z innych źródeł, to jest peroksydazy z chrzanu i peroksydazy z siewek grochu (2, 12, 17, 18). Cytowani autorzy stosowali do rozdziału peroksydazy CM celulozę i DEAE celulozę, które w zastosowaniu do peroksydazy grzybowej nie przyniosły rezultatów.

Frakcje I i II peroksydazy grzybowej wykazują największe powinowactwo do pirogalolu jako donatora wodoru (tab. 2). Spośród przebadanych inhibitorów najbardziej efektywny jest azydek sodu, a następnie tiomocznik i DIECA (tab. 3).

Tab. 3. Wpływ inhibitorów na aktywność peroksydazy grzybowej we frakcji I i II, — stężenie inhibitorów 1×10^{-3}M
Inhibitors influence on peroxidase activity — inhibitors concentration 1×10^{-3}M

Nazwa inhibitora Inhibitor	Procent inhibicji — Percent of inhibition Peroksydaza — Peroxidase	
	Frakcja I Fraction I	Frakcja II Fraction II
Tiomocznik Thiourea	40	42
2,4-dwuchlorofenol 2,4-dichlorophenol	38	45
Wersenian sodu Sodium versenate	17	22
DIECA Diethyldithio-sodium carbaminate	48	30
NaN_3	60	78

Peroksydaza grzybowa (frakcja I i frakcja II) ma ładunek ujemny w środowisku alkalicznym elektroforezy dyskowej. Nie stwierdzono obecności izozymów peroksydazy grzybowej o ładunku dodatnim mimo zastosowania elektroforezy dyskowej w środowisku kwaśnym. Tym samym frakcje I i II peroksydazy grzybowej wykazują podobieństwo do izozymów BCDE peroksydazy chrzanowej izolowanych przez Kaya i współprac. (12). Enzymy te wykazują ruchliwość elektroforetyczną w zakresie 2,8—5,3 mm/godz. Izozymy peroksydazy grzybowej frakcji I i II charakteryzuje większa ruchliwość elektroforetyczna w analogicznych warunkach, która wynosi 20—27 mm/godz. Porównując właściwości izozymów BCDE peroksydazy chrzanowej z peroksydazą grzybową okazuje się, że stężenie NaN_3, konieczne dla 50% inhibicji peroksydazy z obu źródeł, jest analogiczne i wynosi ok. 1 μM/ml (12). Uzyskano również zbliżone wartości stałych Michaelisa w stosunku do H_2O_2 dla frakcji I i II peroksydazy grzybowej w porównaniu z izozymami BCDE peroksydazy z chrzanu (12).

Nie stwierdzono istotnych różnic właściwości elektroforetycznych, stałych kinetycznych i oddziaływania inhibitorów pomiędzy frakcją I i II peroksydazy grzybowej. Jest to zgodne z badaniami Klappera i Hacketta (13) nad peroksydazą z chrzanu. Peroksydaza z chrzanu jest enzymem wielokomponentowym. W doświadczeniach Klappera i Hacketta

oczyszczono główne składniki handlowej peroksydazy chrzanowej. Porównanie właściwości spektralnych, aktywności, ciężaru cząsteczkowego i składu aminokwasowego poszczególnych frakcji peroksydazy z chrzanu nie wykazało istotnych różnic pomiędzy własnościami poszczególnych frakcji, analogicznie do wyników opisanych w niniejszej pracy.

PIŚMIENNICTWO

1. Aurand L. W., Roberts W. M., Cardwel J. T.: Peroxidase. [w:] Methoden der Enzymatischen Analyse. Bergmeyer H. U. ed. Verlag Chemie G.M.B.H. Weinheim 1962, 895—897.
2. Chmielnicka J.: Elektroforetyczne i chromatograficzne rozdzielenie peroksydazy chrzanu. Acta Pol. Pharm. **21**, 395—400 (1964).
3. Davies B. J.: Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann. Acad. Sci. **121**, 404—427 (1964).
4. Fiske C. H., SubbaRow Y.: Method of Fiske and SubbaRow. [w:] Methods in Enzymology. Colowick S.P., Kaplan N.O. ed. Academic Press, 3 New York 1957, 843—844.
5. Flaig W., Haider K.: Die Verwertung Phenolischer Verbindungen durch Weissfäulepilze. Arch. Mikrobiol. **40**, 212—223 (1961).
6. Haider K.: Untersuchungen über den mikrobiellen Abbau von Lignin. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. **198**, 308—316 (1965).
7. Haider K., Lim S. U., Flaig W.: Experimente und Theorien über den Ligninabbau bei der Weissfaule des Holzes und bei der Verrottung pflanzlicher Substanz im Boden. Holzforsch. **18**, 81—88 (1964).
8. Ishikawa H., Oki T.: The Oxidative Decomposition of Lignin. J. Japan Wood Res. Soc. **10**, 207—211 (1964).
9. Ishikawa H., Schubert W. J., Nord F. F.: Investigations on Lignins and Lignification. XXVII. The Enzyme Degradation of Softwood Lignin. Arch. Biochem. **100**, 131—139 (1963).
10. Ishikawa H., Schubert W. J., Nord F. F.: XXVIII. The Degradation by *Polyporus Versicolor* and *Fomes Fomentarius* of Aromatic Compounds Structurally Related to Soft Wood Lignin. Arch. Biochem. **100**, 140—149 (1963).
11. Ishikawa H., Schubert W. J., Nord F. F.: XXX. Enzymic Degradation of Guajacylglycerol and Related Compounds by White-rot Fungi. Biochem. Z. 338, 153—163 (1963).
12. Kay E., Shannon L. M., Lew J. Y.: Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. II. Catalytic Properties. J. Biol. Chem. **242**, 2470—2473 (1967).
13. Klapper M. H., Hackett D. P.: Investigations on the Multiple Components of Commercial Horseradish Peroxidase. Biochem. Biophys. Acta. **96**, 272—282 (1965).
14. Leonowicz A., Trojanowski J.: Egzoenzymes in Fungi Degrading Lignin. I. *Pholiota mutabilis*. Acta Microbiol. Polon. **14**, 55—61 (1965).
15. 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). (1951).
16. Łobarzewski J.: Isolation of Peroxidase from *Inonotus radiatus* Fungus Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, **26**, 35—43 (1971).

17. Sano H.: Studies on Peroxidase Isolated from Etiolated *Alaska pea* Seadlings. I. General Properties. Plant and Cell. Physiol. **11**, 747—756 (1970).
18. 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).
19. Tiselius A., Hjerten S., Levin Ö.: Column Chromatography of Proteins: Calcium Phosphate. [w:] Methods in Enzymology. Colowick S.P., Kaplan N.O. ed. Academic Press, 5, New York 1962, 27—28.
20. Trojanowski J.: Biological Degradation of Lignin. Int. Biodetn. Bull. **5**, 119—124 (1969).

РЕЗЮМЕ

Были установлены оптимальные условия хроматографического очищения пероксидазы от *mycelium* гриба *Inonotus radiatus* пользуясь Biogel P-200, брушитом и гидроксилапатитом. На колонне гидроксилапатита получили раздел пероксидазы на две фракции. Фракции I и II грибной пероксидазы показывают самое большое сходство с пирогаллолом. Активность фракций I и II грибной пероксидазы торможена более всего азидом натрия, тиомочевиной и DIECA. Кинетические константы K_M по отношению к H_2O_2 для грибной пероксидазы близки к полученным для некоторых изозимов пероксидазы из хрена. Изозимы грибной пероксидазы проявляют большую электрофоретическую подвижность, чем изозимы пероксидазы из хрена.

SUMMARY

The optimal conditions for chromatographic purification of peroxidase from the mycelium of the *Inonotus radiatus* fungus with the use of Biogel P-200, brushite and hydroxyapatite was elaborated. On the hydroxyapatite column a separation of peroxidase on two fractions was obtained. Fractions I and II of fungal peroxidase reveal the largest affinity in relation to pirogallol. The activity of fungal peroxidase fractions I and II is most inhibited by sodium azide, thiourea and DIECA. The kinetic constants K_m in relation to H_2O_2 for fungal peroxidase are close to the values obtained for some horseradish peroxidase isozymes. Fungal peroxidase isozymes reveal a greater electrophoretic mobility than peroxidase isozymes from horseradish.