ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA
VOL. XXIX, 4 SECTIO C 1974

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Biochemii

Jerzy ŁOBARZEWSKI

Właściwości egzoperoksydazy z grzyba *Inonotus radiatus*

Свойства эксопериоксидазы с гриба *Inonotus radiatus*

The Properties of Exoperoxidase from the *Inonotus radiatus* Fungus

WSTĘP

Udział peroksydazy grzybowej w preparatach utleniania fenolowych monomerów ligniny, degradacji ligniny, a ogólniej — w rozkładzie drewna wydaje się udowodniony (7, 8, 14, 33, 35, 36, 37, 38). Peroksydaza jest enzymem szeroko rozpowszechnionym u grzybów brunatnej zgnilizny (brown rot fungi) i może być wydzielana do podłoża jako egzoenzym (13, 23, 24, 35). W wielu przypadkach egzoperoksydazie u grzybów towarzyszy lakaza (3, 4, 5, 6, 15, 17, 18, 19, 20). Wybrany do badań grzyb *Inonotus radiatus* nie wykazuje aktywności egzooksydazowej i dlatego stanowi dobry materiał do izolacji i określenia właściwości peroksydazy. Dotychczasowe badania Ishikawy i współprac. (9, 10, 11, 12) nad peroksydazą grzybową nie dawały podstawy do uważania tego enzymu jako EC 1, 11.1.7. oksydoreduktazy donator: nadtlenek wodoru o budowie hemoproteidowej. Przedstawione badania mają na celu wyjaśnienie tej kwestii.

METODY

Enzym peroksydazę izolowano z filtratu po 3-tygodniowej kulturze płynnej grzyba *Inonotus radiatus* (Sow. Ex. Fr. P. Karst, HMIPC No 4335). Mycelium grzyba *Inonotus radiatus* hodowano na 3% wyciągu słodowym. Pożywka była wzbogacona dodatkiem mączki drewna bukowego (22). Objętość pożywki w kolbie Roux: 150 ml i 5 g mączki drzewnej. Po 3 tygodniach hodowli grzyba w temp. 25° oddzielano od pożywki mycelium, a filtrat był materiałem wyjściowym do oczyszczania peroksydazy.

Do oczyszczania peroksydazy używano hydroksyapatytu (32). Wymiary kolumny 3 × 11 cm. Elucję enzymu z kolumny prowadzono przy użyciu liniowego gradientu stężenia buforu fosforanowego o *pH* 7, 0,01—0,1 M.

Jako następne stadium oczyszczania peroksydazy zastosowano sefadeks G-100. Kolumna o wymiarach 2,5 × 45 cm. Elucja enzymu buforem fosforanowym 0,005 M, *pH* 7. We frakcjach z kolumny oznaczano aktywność peroksydazy metodą Auranda i współprac. (1) oraz ekstynkcję przy 280 nm. Na każdym etapie oczyszczania peroksydazy przeprowadzano analizę elektroforetyczną na żelu poliakrylamidowym według metody Daviesa (2). Stosowano 6% żel poliakrylamidowy przy natężeniu 6 mA na rurkę. Czas elektroforezy 70 min. Do rozdziału stosowano bufor boranowy o sile jonowej 0,08 μ i *pH* = 8,3. Do uwidocznienia pasm peroksydazy na elektroferogramach używano reakcji z benzydyną (0,02% w 0,1 M buforze octanowym o *pH* 5,3) oraz H_2O_2 (0,3 M), zmieszanymi w stosunku 4 : 1. Obecność białka na elektroferogramach stwierdzano barwiąc żel roztworem błękitu Coomasie. Używano 0,15% roztworu błękitu Coomasie w mieszaninie metanol, kwas octowy, glicerol, woda w stosunku 16 : 2 : 1 : 23. Czas barwienia 90 min. Elektroferogramy odbarwiano w mieszaninie: metanol, kwas octowy, glicerol, woda w stosunku 8 : 2 : 1 : 29.

Ilościowe oznaczenia aminokwasów w oczyszczonych frakcjach peroksydazy wykonywano metodą Steina i Moora przy pomocy analizatora aminokwasów firmy Beckman typ „Unichrom".

W oczyszczonych preparatach peroksydazy zidentyfikowano cukry na podstawie chromatografii bibułowej według metody Mathiasa (26). Do wywoływania barwnych plam na chromatogramach zastosowano metodę Patridge (29).

Metodę Wintzlera (28) zastosowano do oznaczania ilościowego cukrów.

Zawartość żelaza w oczyszczonych preparatach peroksydazy grzybowej oznaczano metodą Woodrufa (39).

Doświadczenia z inkorporacją ^{55}Fe do peroksydazy grzybowej przeprowadzono wprowadzając do płynnej hodowli grzyba *Inonotus radiatus* po 5 μCi ^{55}Fe na 150 ml pożywki według Lindeberga (17). Hodowle grzyba *Inonotus radiatus* inkubowano w temp. 25° przez 3 tygodnie. Po tym czasie oddzielono pożywkę od mycelium grzyba na lejku Buchnera. Mycelium grzyba zamrażano i odmrażano 5-krotnie w temp. —70°. Mycelium homogenizowano w młynku Pottera i wirowano przy 6000 × g. Osad odrzucano, a supernatant nasycano siarczanem amonu do 100%. Osad białka rozpuszczano w niewielkiej objętości buforu fosforanowego 0,001 M o *pH* 7. Płyn ten dializowano przez 48 godz. w chłodzie. Preparat ten używano do elektroforezy na żelu poliakrylamidowym. Rozkład radioaktywności w 1,5 mm skrawkach elektroferogramów mierzono przy pomocy licznika okienkowego typ 004 i sondy typ PT 67a produkcji Polon, Warszawa.

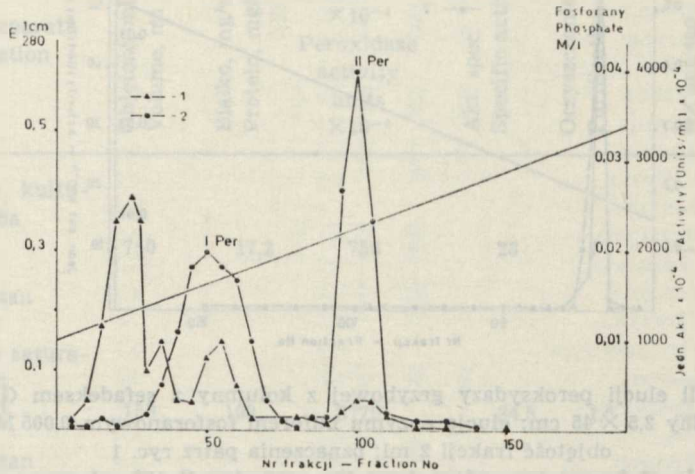
Zawartość białka w preparatach peroksydazy oznaczano metodą Parnasa-Wagnera (27) stosując mnożnik 6,25 oraz metodą Lowry (21).

Oznaczenie ciężaru cząsteczkowego oczyszczonych frakcji peroksydazy grzybowej wykonano metodą kolumnową przy użyciu sefadeksu G-100. Wymiary kolumny 2,5 × 150 cm. Elucja buforem fosforanowym 0,01 M, *pH* 7. Jako wzorców użyto albuminy surowicy wołowej, albuminy jaja kurzego, pepsyny, cytochromu C oraz rybonukleazy.

W celu oznaczenia ilości fenoli w oczyszczonych preparatach peroksydazy grzybowej poddawano je redukcji amalgamatem sodu według metody Martina i współprac. (25). Po redukcji stężenie fenoli określano metodą kolorymetryczną w przeliczeniu na wanilinę (16).

WYNIKI I DYSKUSJA

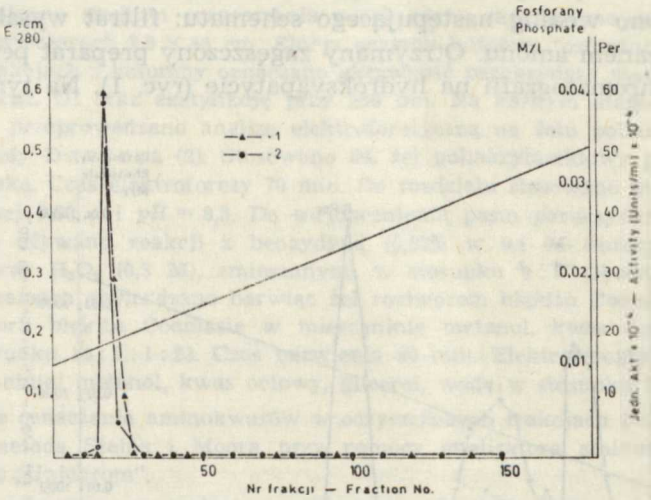
Izolację peroksydazy z filtratu po hodowli grzyba *Inonotus radiatus* przeprowadzono według następującego schematu: filtrat wysalano dwukrotnie siarczanem amonu. Otrzymany zagęszczony preparat peroksydazy poddawano chromatografii na hydroksyapatycie (ryc. 1). Na tym nośniku



Ryc. 1. Profil elucji peroksydazy grzybowej z kolumny z hydroksyapatytem; wymiary kolumny 3 × 11 cm; elucja enzymu gradientem liniowym buforu fosforanowego o *pH* = 7, 0,01—0,1 M; objętość frakcji 2 ml; 1 — ekstynkcja przy 280 nm; 2 — aktywność peroksydazy

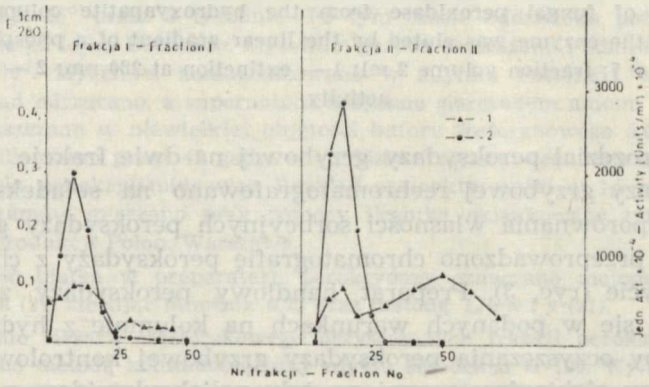
Elution profile of fungal peroxidase from the hydroxyapatite column: column size 3 × 11 cm; the enzyme was eluted by the linear gradient of a phosphate buffer 0.01—0.1 M; *pH* = 7; fraction volume 2 ml; 1 — extinction at 280 nm; 2 — peroxidase activity

uzyskuje się rozdział peroksydazy grzybowej na dwie frakcje. Frakcję I i II peroksydazy grzybowej rechromatografowano na sefadeksie G-100 (ryc. 2). Dla porównania własności sorbcyjnych peroksydazy grzybowej i chrzanowej przeprowadzono chromatografię peroksydazy z chrzanu na hydroksyapatycie (ryc. 3). Preparat handlowy peroksydazy z chrzanu nie absorbuje się w podanych warunkach na kolumnie z hydroksyapatytem. Postępy oczyszczania peroksydazy grzybowej kontrolowano przy pomocy analizy elektroforetycznej na żelu poliakrylamidowym (ryc. 4). Najczystsze preparaty peroksydazy grzybowej frakcji Ia wykazywały 3 prążki, a frakcji IIa — 2 prążki. Liczba prążków o aktywności peroksydazowej jest zgodna z liczbą frakcji białkowych na elektroferogramach. Postępy oczyszczania peroksydazy grzybowej na poszczególnych etapach zebrano w tab. 1. Oznaczono zawartość ilościową i jakościową aminokwasów



Ryc. 2. Profil elucji peroksydazy grzybowej z kolumny z sefadeksem G-100; wymiary kolumny 2,5 × 45 cm; elucja enzymu buforem fosforanowym 0,005 M; $pH = 7$; objętość frakcji 2 ml; oznaczenia patrz ryc. 1

Elution profile of fungal peroxidase from the sephadex G-100 column; column size 2.5 × 45 cm; enzyme was eluted with phosphate buffer 0.005 M; $pH = 7$; fraction volume 2 ml; denotations see Fig. 1



Ryc. 3. Profil elucji peroksydazy z chrzanu z kolumny z hydroksyapatytem; wymiary kolumny 3 × 11 cm; elucja gradientem liniowym buforu fosforanowego 0,01—0,1 M; $pH = 7$; objętość frakcji 2 ml; oznaczenia patrz ryc. 1

Elution profile of horseradish peroxidase from the hydroxyapatite column; column size 3 × 11 cm; enzyme was eluted by the linear gradient of a phosphate buffer 0.01—0.1 M; $pH = 7$; fraction volume 2 ml; denotations see Fig. 1

Tab. 1. Wyniki oczyszczania enzymu peroksydazy z filtratu po 3-tygodniowej kulturze grzyba *Inonotus radiatus* *

Results of purification of peroxidase from a filtrate of 3 weeks old culture of *Inonotus radiatus* *

Nazwa preparatu Preparation	Objętość, ml Volume, ml	Białko, mg/ml Protein, mg/ml	J. akt. per. $\times 10^{-4}$ Peroxidase activity units $\times 10^{-4}$	Akt. spec. Specific activity	Oczyszczanie Purification step	RZ 405/280	Wydajność, % Efficiency, %
Filtrat po kulturze grzyba Filtrate	750	17,2	750	23	I	—	100
100% siarczan amonu I First 100% saturation with $(NH_4)_2SO_4$	150	109	3770	34,5	1,5	—	100
100% siarczan amonu II Second 100% saturation with $(NH_4)_2SO_4$	70	85	7800	92	4	0,175	97
Hydroksyapatyt Frakcja I Hydroxyapatite Fraction I	50	13	3270	253	II	0,6	30
Hydroksyapatyt Frakcja II Hydroxyapatite Fraction II	37	2,05	3850	1 850	80	0,92	26
Frakcja Ia sefadeks G-100 Fraction Ia sephadex G-100	33	1,04	2900	2 030	88	0,65	17,4
Frakcja IIa sefadeks G-100 Fraction IIa sephadex G-100	31	0,13	3600	27 500	1200	0,92	20

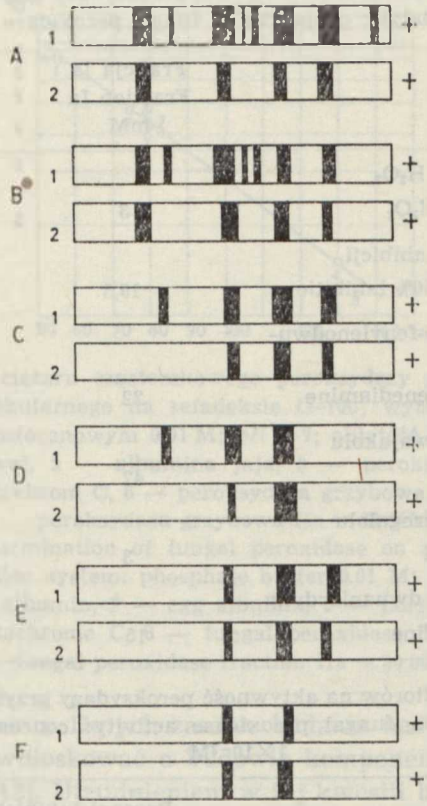
* Pożywka: 3% brzeczka wzbogacona mączką drzewną (buk).

* Medium: 3% malt extract with wood meal (Beech).

Tab. 2. Skład aminokwasowy i cukrowy w peroksydazie grzybowej (g/100 g białka)
Amino acids and sugars composition of fungal peroxidase (g/100 g protein)

Aminokwasy Amino acids	Frakcja Ia Fraction Ia	Frakcja IIa Fraction IIa
Kwas asparaginowy	8,6	9,3
Treonina	4,8	5,1
Seryna	8,2	6,3
Kwas glutaminowy	11,5	17,2
Prolina	5,8	9,9
Glicyna	8,0	7,1
Alanina	6,5	5,6
Cysteina	0,0	0,0
Walina	7,6	5,4
Metionina	0,5	0,7
Izoleucyna	4,8	4,1
Leucyna	8,9	8,5
Tyrozyna	2,1	1,6
Fenyloalanina	3,9	3,7
Lizyna	3,6	3,2
Histydyna	2,1	1,6
NH_3	8,3	15,0
Arginina	3,3	2,6
Cukry ogółem Sugars	8,05	12,0
Galaktoza	+	+
Glukoza	+	+
Mannoza		+
Arabinoza	+	+
Ryboza	+	+
Fukoza	—	—
Ksyloza	—	—
Ramnoza	—	+

oraz cukrów w oczyszczonych preparatach frakcji Ia i IIa peroksydazy grzybowej (tab. 2). W obu frakcjach enzymu obserwuje się stosunkowo dużą ilość kwasu glutaminowego, co determinowałoby ujemny ładunek preparatów peroksydazy podczas elektroforezy na żelu poliakrylamidowym (ryc. 4). Zwracają uwagę różnice pomiędzy składem ilościowym aminokwasów frakcji Ia i IIa peroksydazy, np. seryny, histydyny oraz stosunkowo duża różnica w ilości komponenty cukrowej. Własności katalityczne oczyszczonych frakcji Ia i IIa peroksydazy grzybowej zebrano w tab. 3 i 4. Największe powinowactwo wykazuje peroksydaza grzybowa w stosunku do pirogalolu jako donatora wodoru. Frakcja IIa peroksydazy grzybowej jest bardziej czuła na nadmiar substratu — H_2O_2 niż frakcja



Ryc. 4. Wyniki elektroforetycznego rozdziału białek z filtratu po hodowli grzyba *Inonotus radiatus* na żelu poliakrylamidowym; czas elektroforezy 70 min. przy natężeniu prądu 6 mA na rurkę; barwienie na aktywność peroksydazy benzydyną i nadtlenkiem wodoru, a na białko — błękitem Coomasie; 1 — białko, 2 — enzym, A — filtrat pożywki, B — dwukrotny strąt siarczanem amonu, C — kolumna z fosforanu wapnia frakcja I, D — kolumna z fosforanu wapnia frakcja II, E — kolumna z sefadeksu G-100 frakcja I, F — kolumna z sefadeksu G-100 frakcja II
Results of electrophoretic separation of proteins from the filtrate after the culture of the *Inonotus radiatus* fungus on polyacrylamide gel; electrophoresis time 70 min. at a current intensity of 6 mA per tube; staining for peroxidase activity — benzidine and hydrogen peroxide, for protein — Coomasie blue; 1 — protein, 2 — enzyme, A — filtrate of the culture, B — double precipitate of ammonium sulphate, C — fraction I, D — fraction II, E — fraction Ia, F — fraction IIa

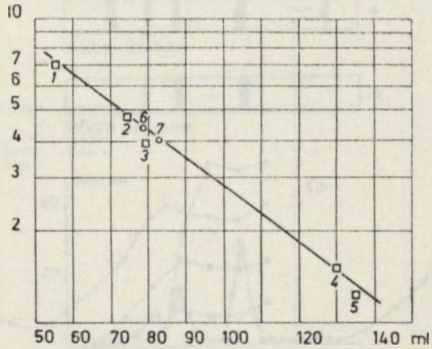
Ia. Najsilniejszym inhibitorem peroksydazy grzybowej był cyjanek potasu. Azotan srebra znany jako inhibitor peroksydazy flawinowej nie wywiera wpływu na peroksydazę grzybową (tab. 4). Ciężar cząsteczkowy peroksydazy grzybowej frakcji Ia wynosi około 42000, a frakcji IIa 39000 ryc. 5). Wielkość cząsteczki peroksydazy grzybowej jest więc zbliżona do

Tab. 3. Własności katalityczne peroksydazy grzybowej
Catalytic properties of fungal peroxidase

Rodzaj stałej Constants	Frakcja Ia Fraction Ia mM	Frakcja IIa Fraction IIa mM
K_m w stosunku do H_2O_2 K_m in relation to H_2O_2	3	2,7
Ilość H_2O_2 do 50% inhibicji H_2O_2 required for 50% inhibition	19,5	6,8
K w stosunku do p-fenylenodwuaminy K app. to p-phenylenediamine	22	18
K w stosunku do gwajakolu K app. to guaiacol	47	33
K w stosunku do pirogalolu K app. to pirogallol	3	2
K w stosunku do o-dwuanizydyny K app. to o-dianisidine	15	11

Tab. 4. Wpływ inhibitorów na aktywność peroksydazy grzybowej: 1×10^{-3}M
Influence of inhibitors on fungal peroxidase activity: concentration of inhibitors 1×10^{-3}M

Inhibitory Inhibitors	Procent inhibicji enzymu Percent of inhibition	
	Frakcja Ia Fraction Ia	Frakcja IIa Fraction IIa
Tiomocznik Thiourea	36	45
2,4-dwuchlorofenol	44	57
Wersenian sodu Sodium versenate	15	18
Dwuetylodwutiokarbaminian sodu Sodium diethyldithiocarbaminate	50	33
Azydek sodu Sodium azide	68	83
Cyjanek potasu Kalium cyjanid	100	100
Azotan srebra Silver nitrate	0	0



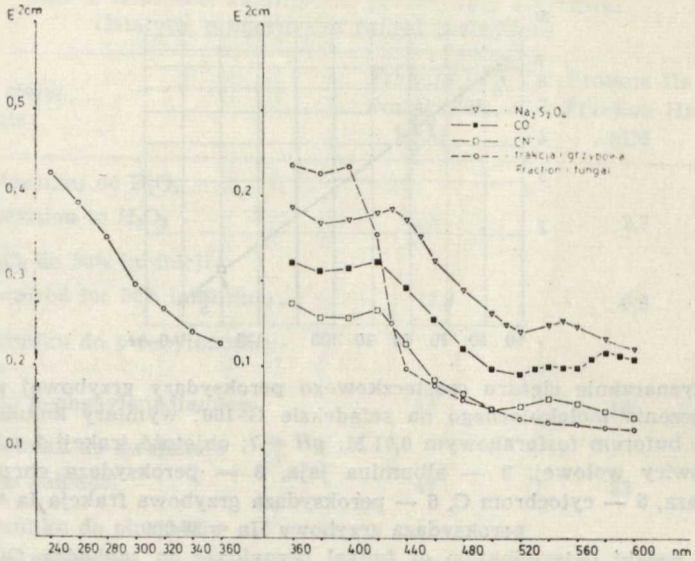
Ryc. 5. Wyznaczanie ciężaru cząsteczkowego peroksydazy grzybowej przy pomocy metody sączenia molekularnego na sefadeksie G-100; wymiary kolumny 2,5 × 150 cm; elucja buforem fosforanowym 0,01 M; $pH = 7$; objętość frakcji 2 ml; 1 — albumina surowicy wołowej, 2 — albumina jaja, 3 — peroksydaza chrzanowa, 4 — rybonukleaza, 5 — cytochrom C, 6 — peroksydaza grzybowa frakcja Ia = 42 000, 7 — peroksydaza grzybowa IIa = 39 000

Molecular weight determination of fungal peroxidase on sephadex G-100; column size 2.5 × 150 cm; elution system: phosphate buffer 0.01 M; $pH = 7$; fraction volume 2 ml; 1 — ox serum albumin, 2 — egg albumin, 3 — horseradish peroxidase, 4 — ribonuclease, 5 — cytochrome C, 6 — fungal peroxidase fraction Ia = 42 000, 7 — fungal peroxidase fraction IIa = 39 000

peroksydazy z chrzanu. Dotychczasowe badania nad peroksydazą grzybową nie pozwalają wnioskować o budowie komponenty niebiałkowej tego enzymu (9, 10, 11, 12). Utrudnieniem w tej kwestii były krzywe absorpcji nie wykazujące wyraźnego maksimum przy 400—410 nm, w tak zwanym paśmie Soreta. Widmo takie wskazuje na obecność układu hemowego jako składnika w białku peroksydazy. Oczyszczone preparaty peroksydazy grzybowej (frakcja Ia i frakcja IIa) wykazują słabe maksimum przy 400 nm (ryc. 6, 7).

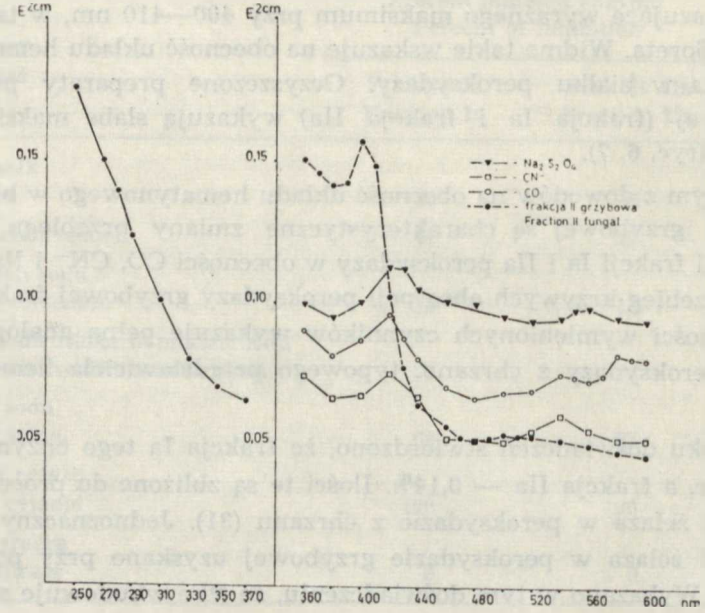
Jednym z dowodów na obecność układu hematynowego w białku peroksydazy grzybowej są charakterystyczne zmiany przebiegu krzywych absorpcji frakcji Ia i IIa peroksydazy w obecności CO, CN^- i $Na_2S_2O_4$ (ryc. 6, 7). Przebieg krzywych absorpcji peroksydazy grzybowej frakcji Ia i IIa w obecności wymienionych czynników wykazuje pełną analogię z krzywymi peroksydazy z chrzanu, typowego przedstawiciela hemoproteidów (31).

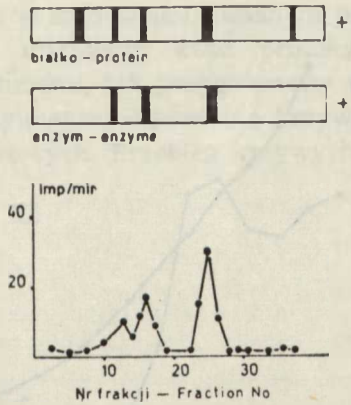
W toku doświadczeń stwierdzono, że frakcja Ia tego enzymu zawiera 0,15% Fe, a frakcja IIa — 0,14%. Ilości te są zbliżone do procentowej zawartości żelaza w peroksydazie z chrzanu (31). Jednoznaczny wynik na obecność żelaza w peroksydazie grzybowej uzyskano przy pomocy ^{55}Fe (ryc. 8). Wykazano w tym doświadczeniu, że ^{55}Fe wbudowuje się do elek-



Ryc 6. Widma absorpcji oczyszczonego preparatu frakcji I peroksydazy grzybowej; na rycinie przedstawiono również zmiany krzywych absorpcji peroksydazy pod wpływem: 1 — $Na_2S_2O_4$; 2 — CO; 3 — CN^-; 4 — krzywa absorpcji frakcji Ia peroksydazy grzybowej w świetle widzialnym i ultrafioletowym

Absorption spectrum of purified fraction Ia of fungal peroxidase; the Figure presents the peroxidase absorption curve changes under the influence of: 1 — $Na_2S_2O_4$; 2 — CO; 3 — CN^-; 4 absorption curve of fraction Ia of fungal peroxidase in visible and ultraviolet light





Ryc. 8. Wyniki doświadczenia z inkorporacją ^{55}Fe do peroksydazy grzybowej; ryciny elektroferogramów na żelu poliakrylamidowym oraz rozkład radioaktywności w żelu; 1 — białko, 2 — enzym

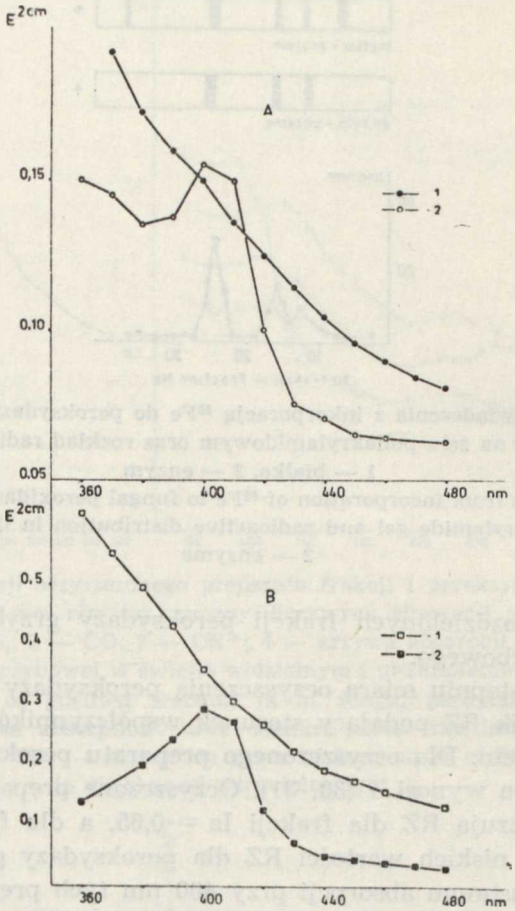
Experiment results from incorporation of ^{55}Fe to fungal peroxidase; electrophorogram patterns on polyacrylamide gel and radioactive distribution in the gel; 1 — protein, 2 — enzyme

troforetycznie rozdzielonych frakcji peroksydazy grzybowej izolowanej z mycelium grzybowego.

W pewnym stopniu miarą oczyszczenia peroksydazy z różnych źródeł jest współczynnik RZ podający stosunek współczynników absorpcji przy 405 nm do 280 nm. Dla oczyszczonego preparatu peroksydazy z chrzanu współczynnik ten wynosi 4 (30, 31). Oczyszczone preparaty peroksydazy grzybowej wykazują RZ dla frakcji Ia = 0,65, a dla frakcji IIa = 0,92. Otrzymanie tak niskich wartości RZ dla peroksydazy grzybowej i słabo zarysowane maksimum absorpcji przy 400 nm tych preparatów sugeruje występowanie pewnych substancji niebiałkowych jako składników tego enzymu. Już we wcześniejszych pracach sugerowano, że substancjami tymi są związki fenolowe (22). Z ryc. 9 wynika, że oczyszczenie peroksydazy grzybowej tylko częściowo usuwa związki barwne z enzymu, mimo zastosowania dwukrotnej chromatografii kolumnowej. Tym samym połączenia pomiędzy związkami barwnymi a peroksydazą grzybową mogą mieć charakter wiązań silnych.

Ryc. 7. Widma absorpcji oczyszczonego preparatu peroksydazy grzybowej frakcji IIa; na rycinie przedstawiono również zmiany krzywych absorpcji peroksydazy pod wpływem: 1 — $Na_2S_2O_4$, 2 — CO; 3 — CN^-; 4 — krzywa absorpcji frakcji IIa peroksydazy grzybowej w świetle widzialnym i ultrafioletowym

Absorption spectrum of purified fraction IIa of fungal peroxidase; the Figure presents the peroxidase absorption curve changes under the influence of: 1 — $Na_2S_2O_4$; 2 — CO; 3 — CN^-; 4 — absorption curve of fraction IIa of fungal peroxidase in visible and ultraviolet light

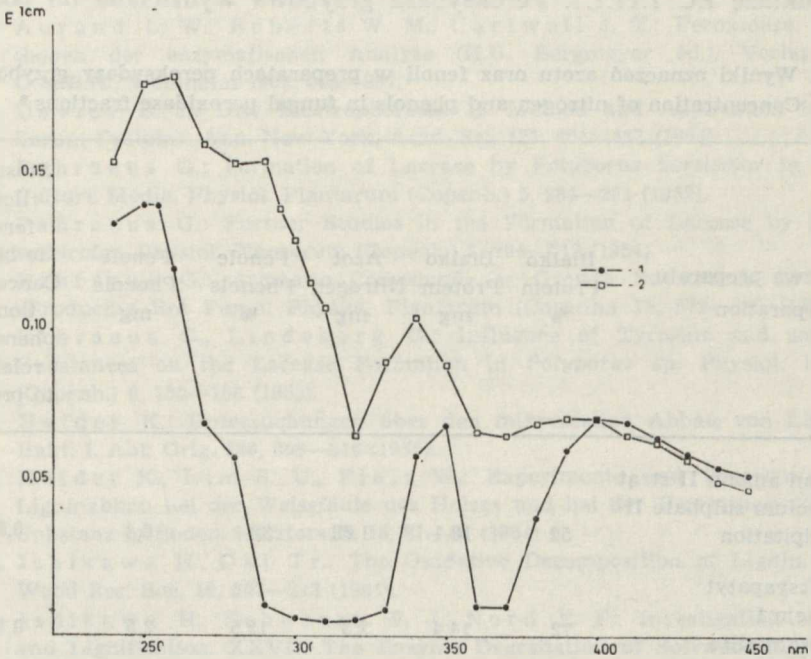


Ryc. 9. Krzywe absorpcji preparatów: A — peroksydazy grzybowej, B — peroksydazy z chrzanu; 1 — preparat peroksydazy nie oczyszczony, 2 — preparat peroksydazy oczyszczony, 3 — peroksydaza z chrzanu + kwas protokatechowy + H_2O_2, 4 — peroksydaza z chrzanu

Absorption curves of: A — fungal peroxidase, B — horseradish peroxidase; 1 — unpurified fungal peroxidase, 2 — purified peroxidase preparation, 3 — horseradish peroxidase + protocatechuic acid + H_2O_2, 4 — horseradish peroxidase

Pewnym wyjaśnieniem tego zagadnienia mogą być zmiany widma absorpcji peroksydazy z chrzanu w obecności kwasu protokatechowego i H_2O_2 (ryc. 9). Utleniony kwas protokatechowy maskuje maksimum absorpcji peroksydazy z chrzanu w paśmie Soreta. W tych warunkach widmo absorpcji peroksydazy z chrzanu ma zbliżony przebieg do krzywej absorpcji peroksydazy grzybowej (ryc. 9). W celu uzyskania dalszych dowodów na powiązania związków fenolowych z peroksydazą grzybową przeprowa-

dzono ekstrakcję eterem w środowisku kwaśnym preparatu tego enzymu. Równocześnie poddano utlenieniu kwas protokatechowy przy udziale H_2O_2 i peroksydazy z chrzanu, tak przygotowany preparat ekstrahowano zakwaszonym eterem etylowym. Porównano krzywe absorpcji obu otrzymanych ekstraktów eterowych. Przebieg krzywych absorpcji jest bardzo zbliżony (ryc. 10).



Ryc. 10. Krzywe absorpcji ekstraktów eterowych z kwasem solnym, peroksydazy grzybowej i mieszaniny peroksydazy z chrzanu, kwasu protokatechowego i nadtlenku wodoru; 1 — peroksydaza grzybowa, 2 — peroksydaza z chrzanu
Absorption curves of acidified ether extracts from fungal peroxidase and a mixture of peroxidase with horseradish acid and hydrogen peroxide; 1 — fungal peroxidase, 2 — peroxidase from horseradish

Dalszym dowodem na obecność fenoli jako integralnych składników peroksydazy grzybowej uzyskano określając ich ilość po redukcji enzymu amalgamatem sodu (tab. 5).

Ilość fenoli związanych z egzoperoksydazą grzybową zmienia się na kolejnych etapach oczyszczania tego enzymu. Sądzić więc można, że związki fenolowe łączą się z białkami podłoża w sposób niespecyficzny. Połączenia pomiędzy fenolami a peroksydazą grzybową mają charakter wiązań dosyć trwałych. Podczas dwukrotnej chromatografii barwne substancje wędrują razem z komponentą peroksydazową. Połączenia fenole-

-białko peroksydazy modyfikują niektóre własności tego enzymu (ryc. 1, 3). Jak wynika też z wcześniejszych doświadczeń własnych, peroksydaza grzybowa wykazuje odmienną ruchliwość elektroforetyczną w porównaniu z peroksydazą z chrzanu (23).

Reasumując przedstawione wyniki doświadczenia, wydaje się, że można uważać peroksydazę grzybową z grzyba *Inonotus radiatus* za H_2O_2 oksydoreduktazę EC 1.11.1.7. Peroksydaza grzybowa wydzielana do podłoża

Tab. 5. Wyniki oznaczeń azotu oraz fenoli w preparatach peroksydazy grzybowej *
Concentration of nitrogen and phenols in fungal peroxidase fractions *

Nazwa preparatu Preparation	Białko Protein %	Białko Protein mg	Azot Nitrogen mg	Fenole Phenols %	Fenole Phenols mg	Stosunek ilości fenolu do białka Concentration of phenols in relation to protein
Siarczan amonu II strąt Ammonium sulphate II precipitation	52	10,4	1,68	32	6,4	0,615
Hydroksyapatyt Frakcja I Hydroxyapatite Fraction I	72	14,4	2,3	12,5	2,5	0,173
Hydroksyapatyt Frakcja II Hydroxyapatite Fraction II	81	16,2	2,6	8,3	1,66	0,103
Sephadex G-100 Frakcja Ia Fraction Ia	77,5	15,5	2,48	7,8	1,56	0,101
Sephadex G-100 Frakcja IIa Fraction IIa	81	16,2	2,6	6,45	1,29	0,080

* Fenole oznaczano w przeliczeniu na kwas wanilinowy po uprzedniej redukcji amalgamatem sodu hydrolizowanych 6n HCl preparatów peroksydazy. Do analiz używano 20 mg próbki liofilizowanych preparatów.

* Concentrations of phenols were measured in calculation to vaniline acid. 20 mg of lyophilised sample were used for each analysis.

w warunkach doświadczenia, a zapewne również enzym ten wytwarzany przez grzyb *Inonotus radiatus* w warunkach środowiska naturalnego występuje w postaci kompleksu ze związkami fenolowymi. Związki fenolowe, łącząc się z peroksydazą grzybową, nadają temu enzymowi specyficzne własności biochemiczne.

PIŚMIENNICTWO

1. Aurand L. W., Roberts W. M., Cartwell J. T.: Peroxidase. [w:] Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer ed.). Verlag Chemie G.M.B.H., Weinheim 1962, 895—897.
2. Davies B. J.: Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann. New York, Acad. Sci. **121**, 404—427 (1964).
3. Fahraeus G.: Formation of Laccase by *Polyporus versicolor* in Different Culture Media. Physiol. Plantarum (Copenh.) **5**, 284—291 (1952).
4. Fahraeus G.: Further Studies in the Formation of Laccase by *Polyporus versicolor*. Physiol. Plantarum (Copenh.) **7**, 704—712 (1954).
5. Fahraeus G.: Aromatic Compounds as Growth Substances for Laccase--Producing Rot Fungi. Physiol. Plantarum (Copenh.) **15**, 572—580 (1962).
6. Fahraeus G., Lindeberg G.: Influence of Tyrosine and some other Substances on the Laccase Formation in *Polyporus* sp. Physiol. Plantarum (Copenh.) **6**, 150—158 (1953).
7. Haider K.: Untersuchungen über den mikrobiellen Abbau von Lignin. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. **198**, 308—316 (1965).
8. Haider K., Lim S. U., Flaig W.: Experimente und Theorien über den Ligninabbau bei der Weissfäule des Holzes und bei der Verrottung pflanzlicher Substanz in Boden. Holzforsch. **18**, 81—88 (1964).
9. Ishikawa H., Oki Tr.: The Oxidative Decomposition of Lignin. J. Japan Wood Res. Soc. **10**, 207—213 (1964).
10. Ishikawa H., Schubert W. J., Nord F. F.: Investigation on Lignins and Lignification. XXVII. The Enzyme Degradation of Softwood Lignin. Arch. Biochem. **100**, 131—139 (1963).
11. Ishikawa H., Schubert W. J., Nord F. F.: XXX. The Degradation by *Polyporus versicolor* and *Fomes Fomentarius* of Aromatic Compounds Structurally Related to Soft Wood Lignin. Arch. Biochem. **100**, 140—149 (1963).
12. 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).
13. Koenigs J. W.: Peroxidase Activity in Brown-Rot *Basidiomycetes*. Arch. Mikrobiol. **73**, 121—124 (1970).
14. Leonowicz A., Trojanowski J.: Exoenzymes in Fungi Degradation Lignin. I. *Pholiota mutabilis*. Acta Microbiol. Polon. **14**, 55—61 (1965).
15. Leonowicz A., Trojanowski J., Nowak G.: Ferulic Acid as the Inductor of Messenger RNA Synthesis Related to Laccase Formation in the Wood Rotting Fungus *Pleurotus ostreatus*. Microbios **6**, 23—28 (1972).
16. Leonowicz A., Wójtowicz B., Trojanowski J.: Model Experiment on the Humification Process. Polish Journal of Soil Science, **1**, 129—136 (1968).
17. Lindeberg G.: Occurrence of Tyrosinase and Laccase in Fruit Bodies and Mycelia of some *Hymenomycetes*. Physiol. Plantarum **5**, 100 (1952).

18. Lindeberg G., Fahraeus G.: Nature and Formation of Phenol Oxidases in *Polyporus zonatus* and *Polyporus versicolor*. Physiol. Plantarum (Copenh.) 5, 277—283 (1952).
19. Lindeberg G., Holm G.: Occurrence of Tyrosinase and Laccase in Fruit Bodies and Mycelia of some *Hymenomycetes*. Physiol. Plantarum 5, 100—114 (1952).
20. Lindeberg G.: Lignin Abbau und Phenoloxydasebildung der Boden *Hymenomycetes*. Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenk. 69, 142—150 (1955).
21. 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).
22. Łobarzewski J.: Isolation of Peroxidase from *Inonotus radiatus* Fungus. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C 26, 34—43 (1971).
23. Łobarzewski J.: Heterogenność peroksydazy indukowanej kwasem syryngowym z mycelium grzyba *Inonotus radiatus*. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C 28, 31 (1973).
24. Łobarzewski J., Sikora A.: Effect of Phenols on the Activity of Peroxidase in Liquid Culture of *Inonotus radiatus* Fungus. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C 27, 87—98 (1972).
25. Martin I. O., Richards S. J., Haider K.: Properties and Decomposition and Binding Action in Soil of Humic Acid Synthesized by *Epococcum nigrum*. Soil. Sci. Soc. Am. Proc. 31, 657—662 (1967).
26. Mathias W.: Über eine einfache Methode für Papierchromatographie Untersuchungen. Naturwiss. 15, 351 (1956).
27. Methods in Enzymology. Colowick S.P., Kaplan N.O. ed. Acad. Press. New York 1957.
28. Methods of Biochemical Analysis. Glick D. ed. Interscience Publishers. 2, New York 1955.
29. Partridge S. M.: Aniline Hydrogen Phtalate as Spraying Reagent for Chromatography of Sugars. Nature 164, 443 (1949).
30. Saunders B. C., Holmes-Siedle A. G., Stark B. P.: Peroxidase, Butterworths, London 1964.
31. 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).
32. Tiselius A., Hjerten S., Levin O.: Column Chromatography of Proteins: Calcium Phosphate. [w:] Methods in Enzymology, Colowick S.P., Kaplan N.O. ed. Acad. Press, New York 1962, 5, 27—28.
33. Trojanowski J.: Biological Degradation of Lignin. Intern. Biodeterioration Bulletin 5, 119—124 (1969).
34. Trojanowski J., Leonowicz A.: Investigation on the Degradation of Lignin by *Pholiota mutabilis*. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C 18, 441—452 (1963).
35. Trojanowski J., Leonowicz A.: The Biodeterioration of Lignin by Fungi. Microbios 3, 247—251 (1969).
36. Trojanowski J., Leonowicz A., Hampel B.: Exoenzymes in Fungi Degrading Lignin. II. Demethoxylation of Lignin and Vanillin Acid. Acta Microbiol. Polon. 15, 17—22 (1966).
37. Trojanowski J., Leonowicz A., Kowalski B.: Wpływ kwasów lignosulfonowych i fenolowych produktów rozkładu ligniny na wzrost i syntezę białka u niektórych *Hymenomycetes*. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, 27, 79—86 (1972).

38. Trojanowski J., Leonowicz A., Wojtaś M.: Exoenzymes in Fungi Degrading Lignin. III. The Effect of Peroxidase on Veratric Acid. Acta Microbiol. Polon. 15, 215—222 (1967).
39. Woodruff C. W.: A Micromethod for Serum Iron Determination. J. Lab. Clin. Med. 53, 955 (1959).

РЕЗЮМЕ

Эксопероксидазы с гриба *Inonotus radiatus* разделили хроматографически на две фракции, пользуясь гидроксилоапатитом. Фракцию I и II рехроматизировали на сафадексе G-100. Определили влияние ингибиторов на очищенные препараты пероксидазы и кинетические константы нескольких избранных донаторов водорода. Обозначили количественно аминокислоты, сумму сахаров и качественный состав сахаров в I и II фракциях пероксидазы. Установили молекулярный вес обеих пероксидаз. Констатирована инкорпорация ^{55}Fe в грибную пероксидазу, что доказывает железопротеидовую структуру этого энзима. Установлено, что феноловые соединения образуют устойчивые соединения с грибной пероксидазой. Проведено количественное определение уровня фенолов в очищенных препаратах грибной пероксидазы.

SUMMARY

The exoperoxidase from the *Inonotus radiatus* fungus was separated chromatographically on two fractions with the use of a hydroxyloapatite. Fractions I and II of peroxidase were rechromatographed on sephadex G-100. The influence of inhibitors on the purified peroxidase preparations and the kinetic constant in relation to a few chosen hydrogen donors was determined. Amino acids were quantitatively determined, the total amount of sugars was given and the qualitative composition of sugars in fraction, Ia and IIa of peroxidase was specified. The molecular weight of both peroxidases was determined. The incorporation of ^{55}Fe to the fungal peroxidase indicated an iron-proteid structure of this enzyme. It was shown that the phenolic compounds form a stable complex with fungal peroxidase. The levels of phenols in the purified fungal peroxidase were quantitatively determined.