

ПРЕПАРАТЫ ГЛЮКОЗООКСИДАЗ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM* ДЛЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Михайлова Р.В., Семашко Т.В., Демешко О.Д.

Институт микробиологии НАН Беларуси

Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4) (ГО) широко используется в пищевой, химической промышленности и медицине. Важным направлением применения ГО является создание на ее основе биосенсоров и биотопливных элементов. Ранее в лаборатории ферментов Института микробиологии НАН Беларуси выделены высокоактивные продуценты внеклеточных ГО *Penicillium adametzii* и *P. funiculosum*, разработаны способы получения ГО различной степени очистки.

Цель данного исследования – получить и охарактеризовать препараты ГО грибов рода *Penicillium* для биокаталитических систем.

Получение очищенных препаратов ГО *P. adametzii* и *P. funiculosum* осуществляли по схемам, включающим комбинацию методов ультрафильтрационного концентрирования фильтрата культуральной жидкости грибов (мембраны с номинально минимальным массовым пределом задерживания 10 кДа), гель-фильтрации (Sephacryl S-300) и ионообменной хроматографии (DEAE-ceramic). Препараты были гомогенны, характеризовались высокой удельной активностью (224-238 ед/мг белка), активность ГО составляла 1289,8-1317,2 ед/мл.

Спектрофотометрический и спектрофлуориметрический анализ показали, что спектры ГО типичны для флавопротеинов. Спектр поглощения имеет максимумы при 380 и 455 нм, спектр возбуждения – 373 и 447 нм, а спектр испускания – 530 и 562 нм.

Определена вторичная структура ГО *P. adametzii* и *P. funiculosum*. Показано, что для данных ферментов характерно наличие структуры, содержащей фрагменты различных конформаций (α -спирали, β -структуры, участки с нерегулярной конформацией), с минимумами молярной эллиптичности при 212 и 216 нм.

Несмотря на то, что данные ферменты по своему аминокислотному составу сходны на 99 %, они значительно различаются по физико-химическим свойствам.

Оптимальные условия для действия ферментов создаются в диапазоне температур 55-70 °С (*P. adametzii*), 55-60 °С (*P. funiculosum*) и диапазоне рН 4,5-7,5 и 5,0-8,0 соответственно. Выявлены различия в термо- и рН-стабильности грибных ГО. Инкубация фермента *P. adametzii* при 50°С в течение часа приводит к снижению активности на 18 %, а ГО *P. funiculosum* – на 45 %. Ферменты *P. adametzii* и *P. funiculosum* стабильны при рН 5,0 и рН 4,0-9,0 соответственно. ГО *P. funiculosum* отличается более высокой стабильностью в щелочной зоне рН. При 24 ч экспозиции (рН 11,0 и 12,0) фермент *P. funiculosum* сохраняет 64 и 58 % активности.

Подобрана буферная система (0,01 М фосфатный буфер, рН 7,0) для проявления максимальной активности ферментов.

Исследованы параметры взаимодействия ГО с ферроценом и его производными (ферроцен-карбоксильная кислотой, ферроцен-карбоксияльдегидом, метил-ферроцен-метанолом). Установлено, что по сравнению с ферментом, модифицированным ферроценом средство ГО, модифицированной его производными, к β -D-глюкозе увеличивается в 1,5-2,1 раз ($K_m=9,4-13,3$ мМ). Наилучшие каталитические характеристики ГО получены при их модификации метил-ферроцен-метанолом. Полученные данные также подтверждены флуориметрическими исследованиями ФАД/ФАДН₂.

В настоящее время в Центре нанотехнологии и материаловедения – NanoTechnas Вильнюсского Университета проводятся исследования по созданию на основе вышеуказанных ГО биотопливной ячейки с улучшенными характеристиками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда фундаментальных исследований Республики Беларусь (проект Б11ЛИТ-012).