

1986, 35, 4

УДК 547.681 : 542.943.7

Наталья ИРХА, Марика КОСК, Ууве КИРСО

**ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА  
ИЗ ВОДОРΟΣЛЕЙ БАЛТИЙСКОГО МОРЯ *CHARA ASPERA***

Natalja IRHA, Marika KOSK, Uuve KIRSO. BALTI MERE VETIKATEST *CHARA ASPERA*  
ENSÜMPREPARAADI ERALDAMINE

Natalya IRHA, Marika KOSK, Uuve KIRSO. ISOLATION OF ENZYMIC PREPARATION FROM  
ALGAE *CHARA ASPERA* OF THE BALTIC SEA

(Представил М. Губергриц)

Загрязнение морской среды канцерогенными полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) — уже установленный факт и относительно Балтийского моря [1, 2]. Обезвреживание водной среды от канцерогенных ПАУ происходит в основном в результате бактериальной деградации [2]. Нами показана также роль макроводорослей в окислительном превращении ПАУ [3]. Можно полагать, что эти процессы катализируются оксидоредуктазными ферментами, которые, как установлено [4], способствуют деградации классического ПАУ — бенз(а)пирена (БП). Отсюда вытекает цель настоящей работы: выделение ферментного белка из макроводорослей и проверка его активности относительно окислительной деградации БП.

Водоросли, собранные у побережья о-ва Сааремаа, содержали в аквариуме с морской водой при непрерывной аэрации и естественном освещении.

Ферментный препарат получали в основном по методике выделения фермента группы растительных оксидоредуктаз — орто-дифенолоксидазы (о-ДФО) [5, 6], вводя некоторые дополнительные операции в соответствии со спецификой вида водорослей и поставленных задач.

Получение ферментного препарата включало несколько этапов и проходило при постоянном охлаждении льдом. Талломы водорослей (сырая масса 20 г) тщательно промывали бидистиллированной водой, высушивали и мелко нарезали, затем гомогенизировали в 1%-ном растворе аскорбата натрия (рН 7,0) в 35 мл лимонно-фосфатного буфера с добавкой 7 г капронового порошка, необходимого для удаления экзогенных фенолов, присутствие которых снижает ферментативную активность препарата. Гомогенат отжимали через плотную ткань, остаток промывали дважды 10 мл раствора аскорбата натрия в буфере.

Далее экстракт пропускали через колонку с полиамидом с толщиной слоя 3 см и диаметром 1 см. В полученный раствор белка добавляли безводный сульфат аммония до 90%-ного насыщения. После отстаивания осажденный белок отфильтровывали и растворяли в 4 мл 0,005 М фосфатного буфера (рН 7,0). Элюат пропускали через колонку, заполненную сефадексом G-50 и уравнивавшую элюирование белка. Собирали все фракции белка, не содержащие сульфата аммония. Концентрацию белка в суммарном ферментном препарате определяли по методу Лоури [7], предварительно построив калибровочный график с раствором кристаллического альбумина из бычьей сыворотки (фирма «Koch-Light», Англия). Выделенный ферментный препарат не обладал *o*-ДФО-активностью, т. е. образования продукта реакции окисленного 1% пирокатехина (специфического субстрата *o*-ДФО) и 0,2% *l*-пролина не наблюдалось.

Экспериментально установлено, что присутствие выделенного белка в водной среде, содержащей БП (рН 7,5; 0,02 М фосфатный буфер), в течение часа экспозиции вызывает снижение концентрации канцерогена на 74% от исходного значения.

Полученная величина превышает аналогичную в процессе автоокисления примерно на 30%. При концентрации белка 13,0 мг/л активность препарата, выраженная в стандартных единицах [7], составляла  $4,0 \cdot 10^{-4}$  мкмоль<sub>БП</sub> · мин<sup>-1</sup>.

Стационарная кинетика процесса удовлетворительно описывается уравнением Михаэлиса—Ментена.

Таким образом, установлено, что ферментный белковый препарат, выделенный из морских водорослей *Chara aspera* и содержащий ферменты группы оксидоредуктаз, способен окислять канцерогенные ПАУ и способствовать самоочищению морской среды.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Suess, M. J. The environmental load and polycyclic aromatic hydrocarbons. — Sci. total environ., 1976, 6, 239—250.
2. Цыбань А. В., Шабад Л. М., Хесина А. Я., Володкович Ю. Л., Панов Г. В., Мирошниченко Н. М., Ермаков Ю. А. Циркуляция и биодеградация канцерогенного углеводорода бенз(а)пирена в морской среде. — Докл. АН СССР, 1980, № 6, 1490—1493.
3. Irha, N., Kirso, U., Urbas, E., Kukk, H. Oxidation and accumulation of benzo(a)pyrene in the presence of the Baltic algae. — Acta hydrochim. et hydrobiol., 1983, 11, N 4, 449—456.
4. Kirso, U., Belykh, L., Stom, D. Oxidation of benzo(a)pyrene catalyzed by phenol oxidases of alga *Nitella* sp. and potato tubers. — Acta hydrochim. et hydrobiol., 1981, 9, N 4, 401—406.
5. Бельх Л. И., Стом Д. И., Кирсо У. Э. О трансформации бенз(а)пирена в смеси с фенолами под влиянием водорослей и их ферментных препаратов. — Водные ресурсы, 1981, № 4, 183—185.
6. Бузун Г. А. Выделение ферментов из растений в присутствии эндогенных фенолов. — В кн.: Успехи биологической химии, вып. 13, М., 1972, 102—115.
7. Практикум по биохимии. Под ред. Н. П. Мешковой и С. Е. Северина. М., 1979.

Институт химии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
18/IV 1986