

УДК 547.681 : 542.943.7

Наталья ИРХА, Марика КОСК, Ууве КИРСО

**ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА
ИЗ ВОДОРosЛЕЙ 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 уравнивающую 0,005 М фосфатным буфером, этим же буфером осуществляли 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_{БП} · мин⁻¹.

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