

# Zastosowanie częściowo oczyszczonej i immobilizowanej peroksydazy uniwersalnej syntetyzowanej przez szczep *Bjerkandera adusta* CCBAS 930 (VP/Ba) do usuwania dokсорubicyny

Rybczyńska-Tkaczyk K.

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

## Wstęp

W ostatnich latach wzrasta produkcja i zużycie leków przeciwnowotworowych a tym samym zawartość tych farmaceutyków lub ich metabolitów w ściekach. Cytostatyki wykazują wysoką odpornością na czynniki środowiska, właściwości kancerogenne oraz mutagenne. Zwiększona trwałość farmaceutyków utrudnia ich całkowitą degradację podczas procesów oczyszczania ścieków oraz przyczynia się do ich akumulacji w środowisku. Pozostałości tych leków mogą przedostawać się do wód powierzchniowych oraz podziemnych co zagraża zarówno organizmom wodnym jak i zdrowiu człowieka.

## Cel pracy

Celem pracy była ocena usuwania antybiotyku antracyklinowego – dokсорubicyny (DOX) przez częściowo oczyszczoną i immobilizowaną peroksydazę uniwersalną (VP/Ba) syntetyzowaną przez szczep *Bjerkandera adusta* CCBAS 930.

## Materiał i metody

### Szczep grzyba

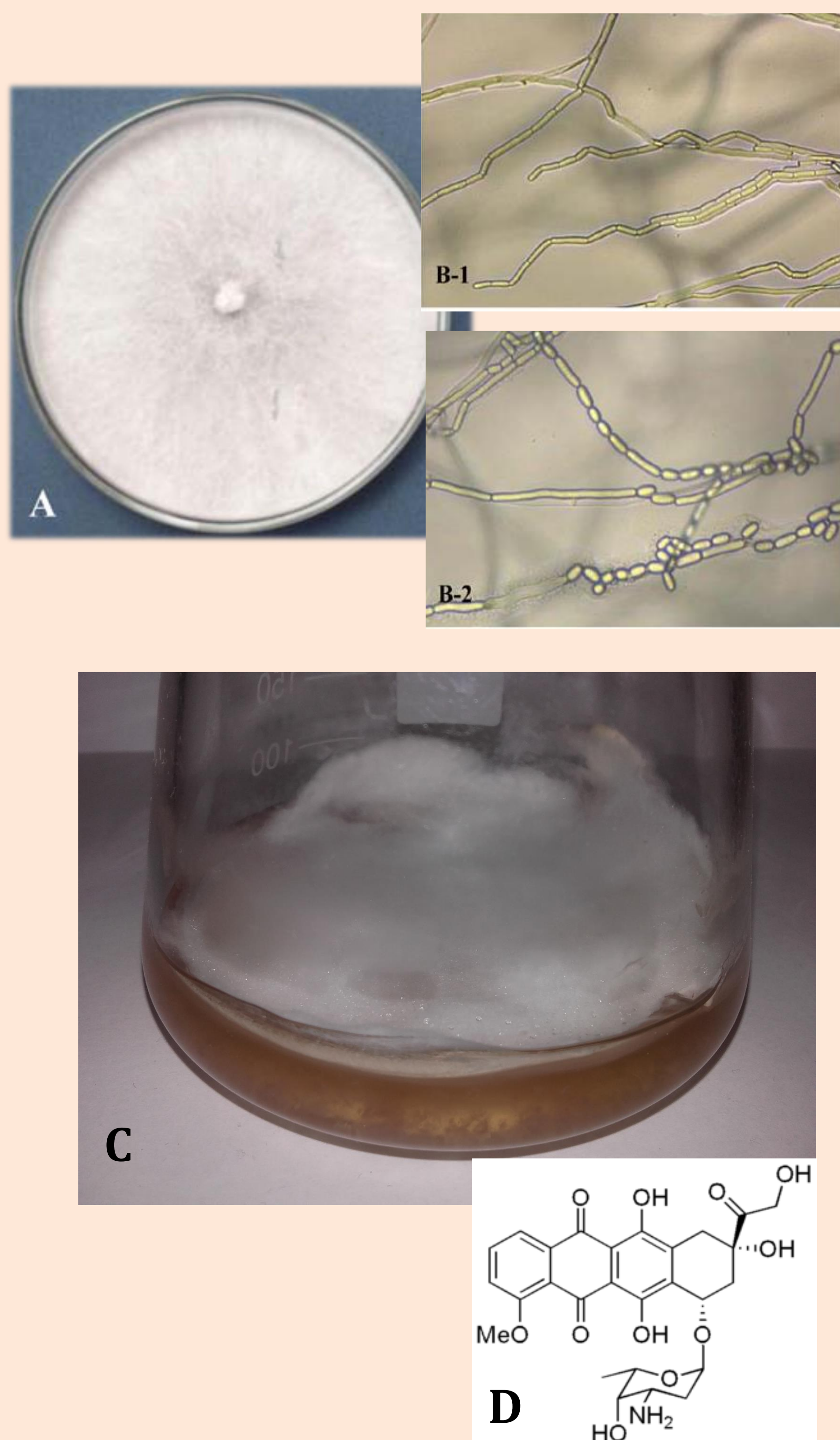
Anamorficzne stadium podstawczaka białej zgnilizny drewna *B. adusta* CCBAS 930 wyizolowano z czarnej ziemi (A - Morfologia kolonii szczepu *B. adusta* CCBAS 930, B1-wczesny etap rozwoju grzybni i mikromorfologia dojrzałej grzybni (B2) *B. adusta* CCBAS 930)(Korniłowicz-Kowalska i in., 2006, Korniłowicz-Kowalska, Rybczyńska, 2012).

### Hodowla *B. adusta* CCBAS

Hodowlę szczepu *B. adusta* CCBAS 930 prowadzono w warunkach statycznych (21 dni, 26°C) stosując 100ml płynnego podłoża mineralnego z dodatkiem dokсорubicyny (DOX) (10 µg/ml). Inokulum stanowił 1ml (10<sup>5</sup> j.t.k ml<sup>-1</sup>) homogenizowanej grzybni *B. adusta* CCBAS otrzymany z płynnej 10-o dniowej hodowli na podłożu maltozowym (C-21-o dniowa hodowla szczepu *B. adusta* CCBAS 930 na podłożu mineralnym z dodatkiem dokсорubicyny (10 µg/ml)). Dokсорubisyna jest antybiotykiem antracyklinowym stosowanym w leczeniu chorób nowotworowych (D).

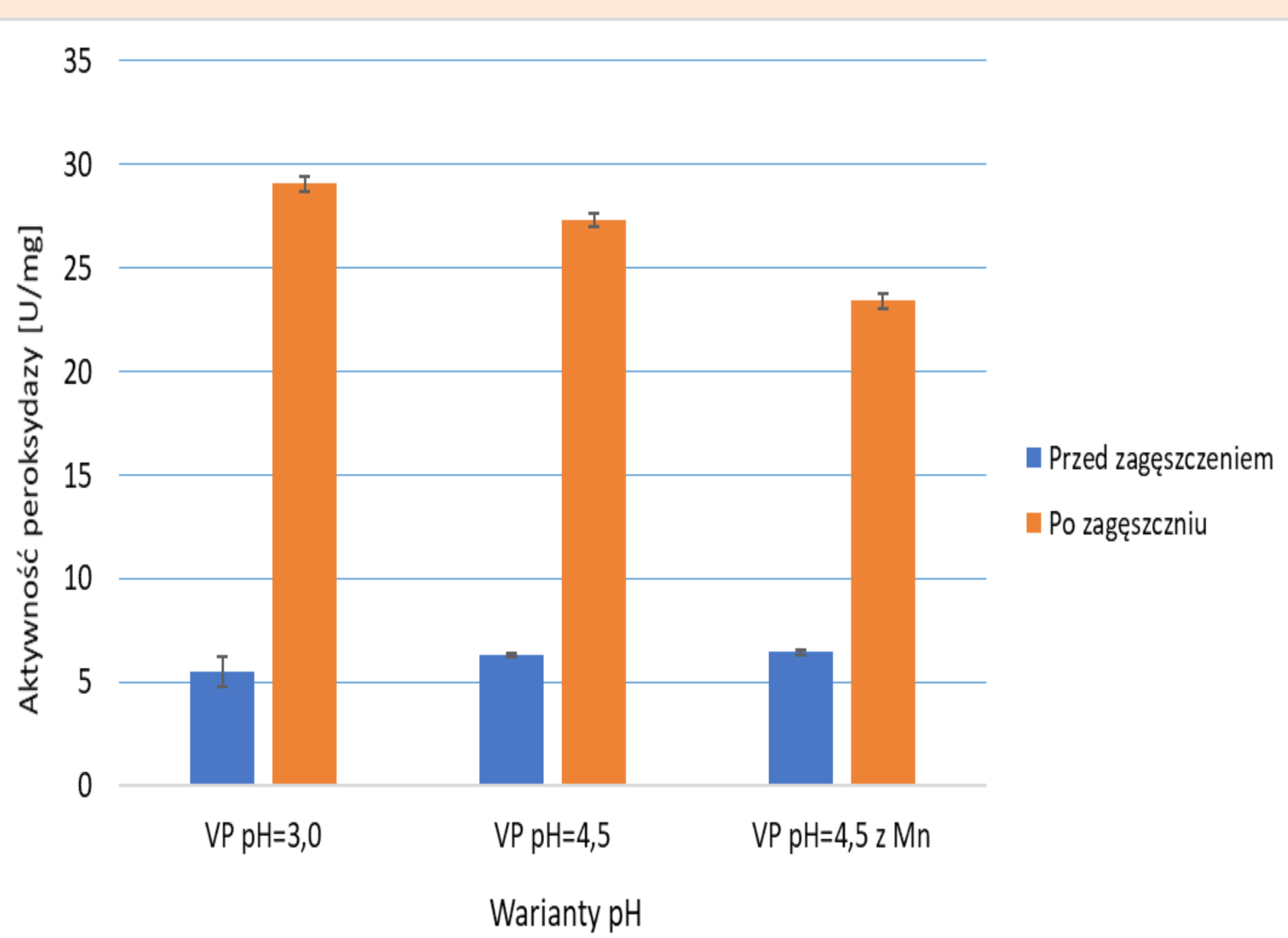
### Analizy biochemiczne

W klarownych płynach pohodowlanych okresowo oznaczano zawartość białka oraz aktywność peroksydazy uniwersalnej (VP) w kierunku utleniania 2,6-dimetoksyfenolu (DMP) w buforze o pH=3,0 oraz pH=4,5 w obecności jonów Mn<sup>2+</sup> jak również bez ich dodatku. W celu otrzymania enzymatycznego ekstraktu VP, w 21 dniu hodowli oddzielono grzybnię od płynu pohodowlanego poprzez sączenie oraz filtrowanie przez sterylne filtry strzykawkowe (ø=0,22 µm). Następnie wytrącono białko z supernatantu (100ml) metodą wysalania do 80% nasycenia siarczanem amonu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i wirowano (7000 rpm/min., 20 min., 4°C). Otrzymany osad rozpuszczono w buforze malonowym (50mM, pH = 4,5) i zagęszczono na membranie Amicon Ultra-15, Millipore 30 kDa (4000 rpm/min., 20 min., 4°C). Zagęszczony płyn pohodowlany (10 ml, aktywność VP=10 U/ml) immobilizowano wykorzystując 4% alginianu sodu (28°C, 130 rpm/min). Po 20 minutach alginian z dodatkiem VP dodawano kroplami przy użyciu sterylnej strzykawki do 50 ml 0,2-molowego CaCl<sub>2</sub>. Po 24h, 12,5g zimmobilizowanej VP wprowadzono do 50 ml roztworów DOX (10µg/ml). Doświadczenie przeprowadzono w warunkach wytrząsanych (130 rpm/min., 96h, 30°C). Ocenę aktywności dekoloryzacyjnej zimmobilizowanego enzymu przeprowadzono spektrofotometrycznie poprzez okresowy pomiar absorbancji (A<sub>480nm</sub>) oraz zawartość związków fenolowych.

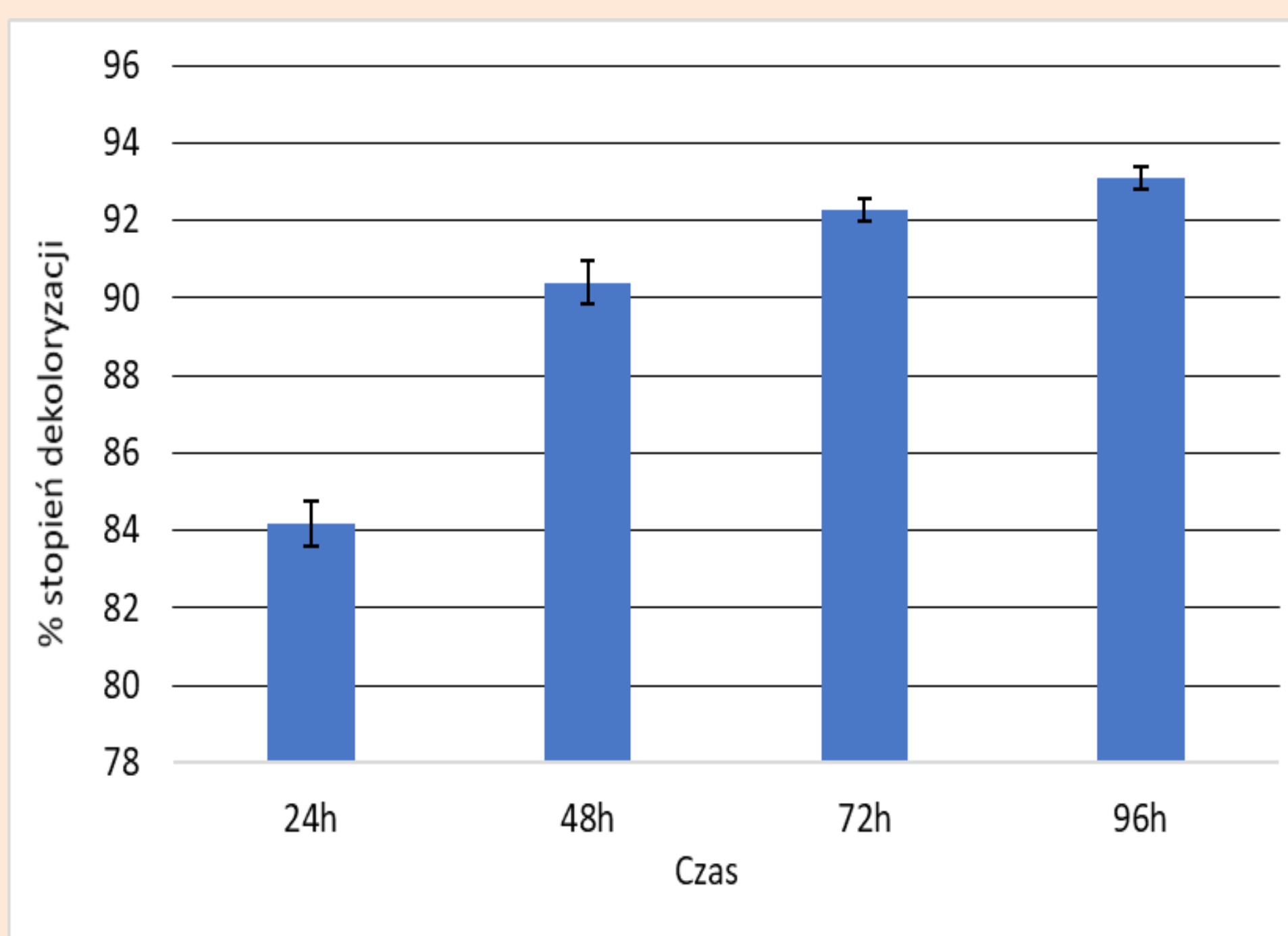


## Ważniejsze wyniki i wnioski

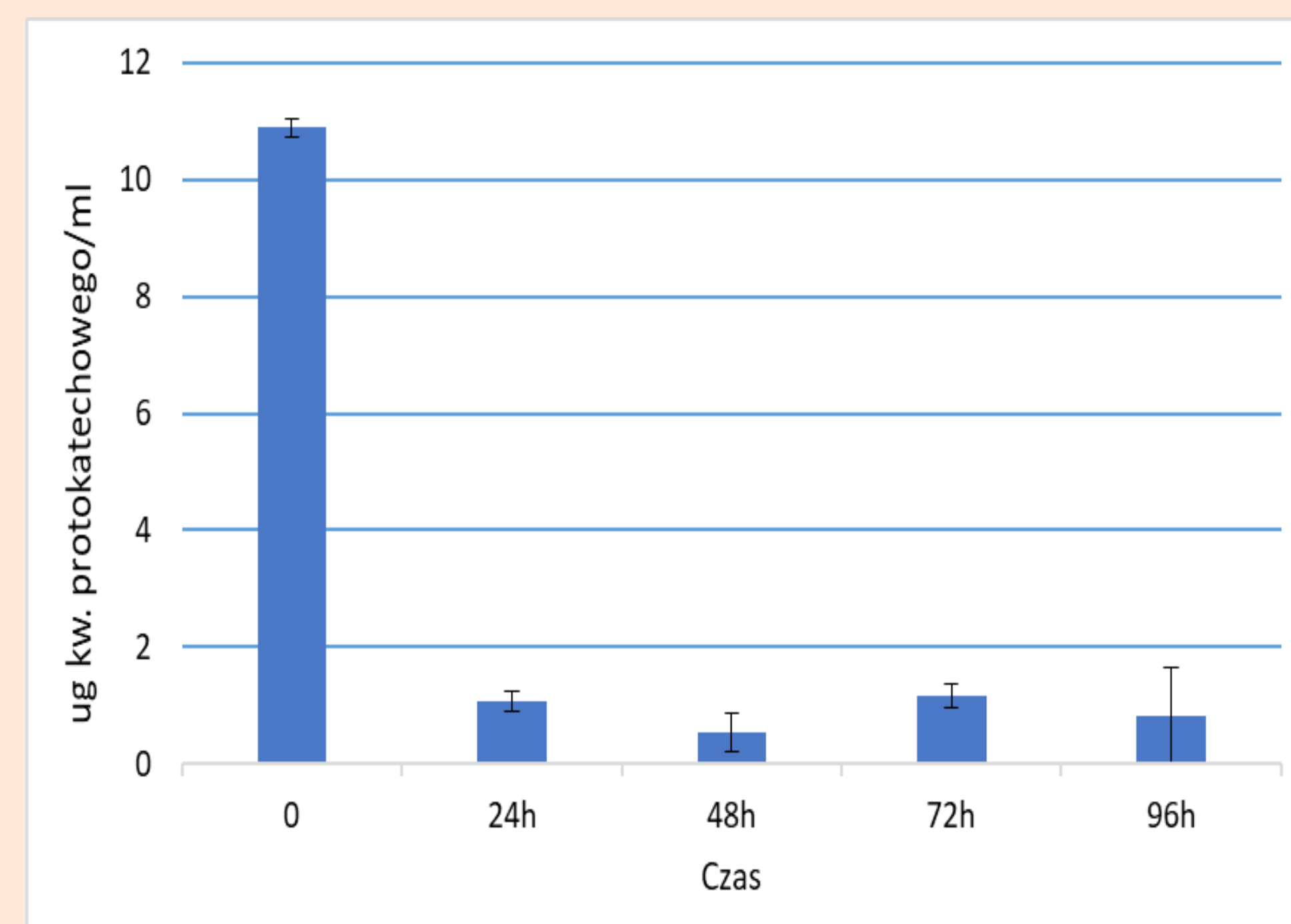
- ✓ W hodowlach *B. adusta* CCBAS 930 z dodatkiem DOX, aktywność VP/Ba systematycznie rosła, przy czym najwyższą aktywność VP/Ba stwierdzono 21 dnia
- ✓ Aktywność VP/Ba mierzona w buforze o pH=3,0 przed zagęszczeniem wynosiła 5,52U/mg, natomiast po zagęszczeniu wzrosła do 29,06 U/mg, natomiast w buforze o pH=4,5 z i bez dodatku Mn<sup>2+</sup> po zagęszczeniu wzrosła 3-5 krotnie i wynosiła odpowiednio: 27,29 i 23,39 U/mg (Rys.1).
- ✓ Zastosowanie immobilizowanej peroksydazy VP/Ba znacznie skraca czas usuwania DOX (84% po 24h), stopień dekoloryzacji tego substratu systematycznie wzrastał, osiągając maksimum (93,12%) po 96h (Rys.2)
- ✓ Po zastosowaniu immobilizowanej VP/Ba (10 U/ml) zawartość związków fenolowych spadała o 90,16% już po 24h (Rys.3)



Rys.1. Aktywność peroksydazy VP/Ba (U/mg) mierzona w 21-o dniowym płynie pohodowlanym przed i po zastosowaniu częściowego oczyszczania



Rys. 2. Stopień usuwania (dekoloryzacji) dokсорubicyny (10ug/ml) przez immobilizowaną peroksydazę VP/Ba



Rys. 3. Zawartość związków fenolowych (µg kwasu protokatechowego/ml)