

О СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ОКСИДАЗЫ ИЗ БАЗИДИОМИЦЕТА *NEONOTHOPANUS NAMBI*

Могильная О.А., Ронжин Н.О., Посохина Е.Д., Бондарь В.С.

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

ул. Академгородок, 50/50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: ol_mog@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0591

Аннотация. Из мицелия высшего гриба *Neonothopanus nambi* с помощью мягкой обработки биомассы β -глюкозидазой выделен внеклеточный фермент с оксидазной активностью. В предлагаемой работе приводятся экспериментальные данные о субстратной специфичности и некоторых свойствах выделенного фермента. Как показали эксперименты, внеклеточная оксидаза из базидиомицета *N. nambi* проявляла активность с большинством ароматических соединений, выбранных в качестве модельных субстратов. При этом следует отметить, что фермент проявлял каталитическую функцию без добавки в реакционную смесь пероксида водорода и иных дополнительных медиаторов. Наибольшая активность фермента наблюдалась при использовании в качестве субстратов вератрилового спирта и двухатомных фенолов – гидрохинона и гваякола. Меньший уровень активности изучаемой оксидазы зарегистрирован в реакциях с ароматическими азосоединениями (АБТС, диаминобензидин, о-дианизидин). В реакции с двухатомным фенолом резорцином и монофенолом каталитическая эффективность фермента была существенно ниже. Для наиболее эффективно окисляемых субстратов были определены кинетические параметры ферментативных реакций. Было показано, что добавки хелатора двухвалентных ионов металлов (ЭДТА) не влияли на активность фермента. В то же время, добавки SH реагента (ДТТ) увеличивали каталитическую эффективность изучаемой оксидазы. Совокупность полученных данных свидетельствует, что внеклеточная оксидаза гриба *N. nambi* катализирует окисление широкого спектра ароматических соединений в слабощелочных и нейтральных условиях без добавления дополнительных медиаторов (в частности, пероксида водорода). Это создает предпосылки для изучения применимости данного фермента в биомедицинской аналитике.

Ключевые слова: высшие грибы, базидиомицет *Neonothopanus nambi*, внеклеточная оксидаза, вератриловый спирт, фенольные соединения.

Базидиальные грибы обладают уникальными ферментными системами, участвующими в разложении растительных биополимерных материалов (лигнин, целлюлоза). Благодаря значительной окислительно-восстановительной способности грибных ферментных систем, исследователи интенсивно изучают возможности их применения для деградации ксенобиотиков и биоремедиации загрязненных природных объектов. Высокая селективность, образование малотоксичных продуктов в ходе катализируемых реакций, сохранение функциональной активности в широком диапазоне pH, температур, концентраций поллютантов и, что важно, без привлечения медиаторов, позволяют говорить о перспективности использования грибных ферментов (и грибных ферментных систем) в разработке «зеленых» биотехнологий [1-5]. Например, для конструирования сенсорных и аналитических систем активно исследуют применимость секретируемых ферментов высших грибов, в частности, ФАД-, гем- и медьсодержащих оксидоредуктаз [6-8].

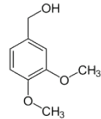


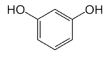

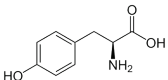
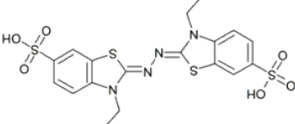
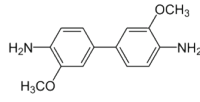
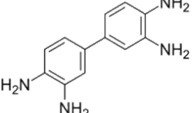
Однако ряде случаев применение в аналитических приложениях секретируемых грибных оксидаз затруднено из-за их недостаточной стабильности, что стимулирует исследования, направленные на поиски новых видов базидиомицетов в качестве перспективных источников получения оксидоредуктаз, изучение возможностей увеличения продукции этих ферментов в грибной биомассе, выявление грибных оксидаз с новыми свойствами [9-12]. Разрабатываются и совершенствуются методы выделения этих ферментов из грибной биомассы и способы их иммобилизации на разных носителях с целью повышения резистентности к действию негативных факторов и сохранения каталитической функции при многократном использовании [13-15]. При этом следует сказать, что одна из особенностей грибных секретируемых оксидоредуктаз заключается в большом количестве изоформ этих ферментов. В свою очередь, это открывает возможности для пополнения пула известных оксидоредуктаз новыми секретируемыми высшими грибами ферментами с окислительными свойствами, как для научных исследований, так и для практического применения в аналитике и биокатализе [16-20]. В представляемой работе приводятся экспериментальные данные о некоторых свойствах оксидазы, секретируемой базидиомицетом *Neonothopanus nambi*, и ее каталитической эффективности при окислении ароматических соединений.

Для исследований использовали мицелий высшего гриба *N. nambi* (штамм IBSO 2391 из Коллекции культур микроорганизмов ССIBSO 836 Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск). Эксперименты проводили с шарообразными пеллетами мицелия диаметром 2-7 мм (рис. 1), которые получали при глубинном культивировании гриба в жидкой питательной среде PDB («HiMedia Laboratory», Индия). Методические подробности выделения внеклеточных ферментов из биомассы мицелия базидиомицета *N. nambi* представлены нами в предыдущих работах [21,22]. В кратком изложении схему выделения изучаемой оксидазы можно представить следующим образом. После культивирования пеллеты мицелия извлекали из питательной среды и

многokrатно промывали деионизированной (ДИ) водой (Milli-Q system, «Millipore», США) для удаления остатков питательной среды и метаболитов. Внеклеточные ферменты (в том числе изучаемую оксидазу) получали обработкой биомассы β -глюкозидазой («Serva», Германия). Отмытые пеллеты помещали в свежий объем ДИ воды, содержащий β -глюкозидазу в концентрации 0,5 МЕ/мл, и инкубировали при 25 °С в течение 24 ч при медленном перемешивании со скоростью 80 об/мин на шейкере OS-20 («BIOSAN», Латвия). После инкубации жидкую часть отделяли от биомассы фильтрацией через бумажный фильтр и диализовали через мембрану Amicon 30 кДа («Merk Millipore», Германия) для концентрирования выделенных внеклеточных ферментов и удаления низкомолекулярных соединений. Полученный ферментный концентрат использовали для разделения белковых компонентов и выделения изучаемой внеклеточной оксидазы с помощью колоночной хроматографии на Sephadex G-200 («Pharmacia», Швеция). Наличие оксидазной активности в хроматографических пробах оценивали спектральным методом (спектрофотометр UV-1800, «Shimadzu», Япония) по уровню поглощения при 309 нм, отражающему выход продукта реакции окисления вератрилового спирта («Sigma», США). Раствор реагента готовили *in situ* в ДИ воде, при скрининге хроматографических проб его концентрация в реакционной смеси составляла 1 мМ. Хроматографические фракции с наибольшей оксидазной активностью объединяли и концентрировали диализом через мембрану 30 кДа. Сконцентрированный ферментный препарат использовали в исследованиях.

При оценке субстратной специфичности внеклеточной оксидазы, выделенной из мицелия базидиомицета *N. nambi*, в качестве модельных субстратов использовали ряд ароматических соединений, имеющих структурные отличия (табл. 1). Выбор ароматических соединений определялся тем, что их широко используют в научных

Таблица 1. Ароматические соединения, использованные в качестве модельных субстратов для оценки эффективности их окисления внеклеточной оксидазой из высшего гриба *N. nambi*

Ароматическое соединение	Структурная формула	Длина волны регистрации продукта реакции (нм)
Ароматические спирты: вератриловый (3,4-диметоксибензиловый) спирт («Sigma-Aldrich», США)		309
Одно- и двухатомные фенолы: фенол (гидроксибензол) («Fluka», Германия)		506
гидрохинон (бензол-1,4-диол) («Реахим», РФ)		246
резорцин (бензол-1,3-диол) («Реахим», РФ)		273
Метоксифенолы: гваякол (2-метоксифенол) («Sigma-Aldrich», США)		467
Ароматические амины: Тирозин (2-амино-3-(4-гидроксифенил)пропановая кислота) («Fluka», Германия)		478
Ароматические азосоединения: АБТС (2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота) («AppliChem», Германия)		420
о-дианизидин (3,3'-диметокси-4,4'-бензидин) («Fluka», Германия)		442
ДАБ (3,3'-диаминобензидин) («AppliChem», Германия)		462

исследованиях и практической аналитике для диагностики и идентификации оксидазных ферментов [3-6,13,20]. Каталитическую эффективность фермента с модельными субстратами оценивали спектрофотометрически (UV-1800) по выходу продуктов реакций, регистрируемому по величине поглощения при соответствующих длинах волн (таблица 1), и выражали в единицах оптической плотности на 1 мг белка. Концентрацию белка в образцах фермента определяли биуретовым методом, используя БСА в качестве стандарта. Концентрацию ароматических соединений в реакционных смесях варьировали для определения зависимостей выхода продуктов и кинетических характеристик ферментативных реакций. Определение температурного оптимума каталитической активности выделенной оксидазы проводили в диапазоне температур реакционной среды от 20 до 50 °С. Выход продукта оценивали после инкубации содержащих фермент и субстрат реакционных смесей в течение 15 мин при разных температурах (термостат ТВ-85 Thermo Batch, «Shimadzu», Япония). При изучении эффективности функционирования фермента в зависимости от pH среды использовали серию 50 мМ Na-ацетатных буферов со значениями pH от 3 до 8. В экспериментах проводили также оценку каталитической эффективности оксидазы гриба *N. nambi* при воздействии хелатора двухвалентных ионов металлов ЭДТА («Serva», Германия) и SH реагента ДТТ («AppliChem», Германия). Для обработки фермента использовали диапазон концентраций указанных реагентов от 0,1 до 1 мМ.

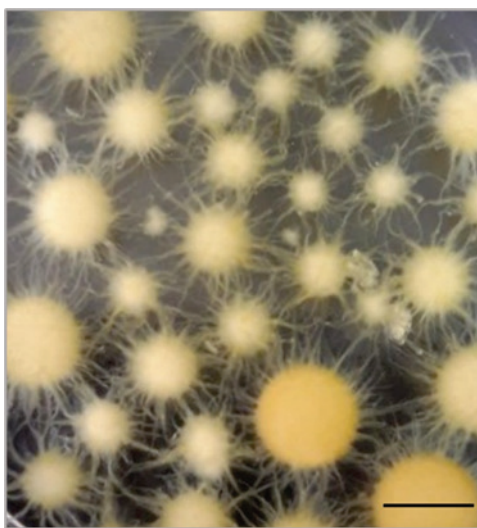


Рисунок 1. Внешний вид пеллет мицелия базидиомицета *N. nambi*, выращенных при глубинном культивировании гриба в жидкой питательной PDB среде. Изображение получено с помощью фотокамеры PowerShot S50 («Canon», Япония). Масштабная линейка – 5 мм

Как показали исследования, при гель-фильтрационной хроматографии ферментного концентрата на Sephadex G-200 катализирующая окисление вератрилового спирта внеклеточная оксидаза из гриба *N. nambi* обнаруживается в белковой фракции с нативной молекулярной массой белка 80 кДа. Спектральные исследования белковой фракции, содержащей данный фермент, не выявили в белке каких-либо хромофорных компонентов. Следует сказать, что представленные данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований [21].

В экспериментах было показано, что выделенная из базидиомицета *N. nambi* внеклеточная оксидаза функционирует в широких интервалах температур и pH среды (рис. 2). Как видно из представленных данных, фермент эффективно катализирует окисление вератрилового спирта в диапазоне температур от 20 до 45 °С, проявляя максимальную активность при температурах 22–35 °С. Видно также, что оксидаза наиболее эффективно функционирует при нейтральных и слабокислых значениях pH среды, проявляя максимальную активность при pH 6,0.

В исследованиях было установлено, что внеклеточная оксидаза из базидиомицета *N. nambi* катализирует окисление большинства ароматических соединений, выбранных в качестве модельных субстратов (рис. 3), что указывает на ее широкую субстратную специфичность. При этом следует отметить, что фермент проявлял каталитическую функцию без добавки в реакционную смесь пероксида водорода и иных дополнительных медиаторов. Как видно из представленных данных (рис. 3), наибольшая каталитическая активность фермента наблюдалась при использовании в качестве субстратов вератрилового спирта и двухатомных фенолов – гидрохинона и гваякола. Меньший уровень активности изучаемой оксидазы зарегистрирован в реакциях с ароматическими азосоединениями (АБТС, ДАБ, о-дианизидин). В то же время, из представленных данных видно, что в реакциях с двухатомным фенолом резорцином и монофенолом каталитическая эффективность фермента была существенно ниже и он совсем не проявлял каталитическую активность в реакции с тирозином (рис. 3).

Для наиболее эффективно окисляемых ароматических соединений (рис. 3) были получены зависимости скоростей ферментативных реакций от концентрации соответствующих субстратов (зависимости Михаэлиса - Ментен). Из полученных кинетических параметров ферментативных реакций (табл. 2) следует, что изучаемая оксидаза обладает наилучшим сродством к вератриловоому спирту и окисляет его с наибольшей эффективностью. С меньшей эффективностью фермент окисляет гидрохинон и гваякол.

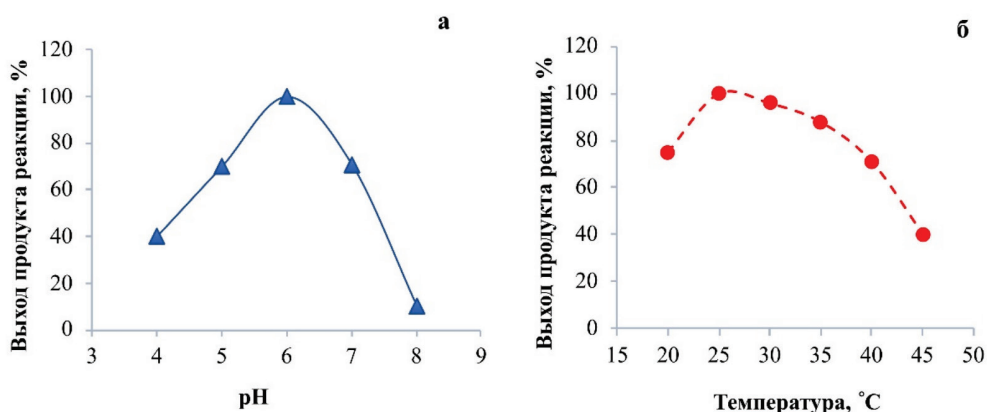


Рисунок 2. Выход продукта реакции окисления вератрилового спирта, катализируемого внеклеточной оксидазой из базидиомицета *N. nambi*, в зависимости от рН (а) и температуры (б) реакционной среды. Представленные данные нормированы на максимальные значения выхода продукта в рядах измерений

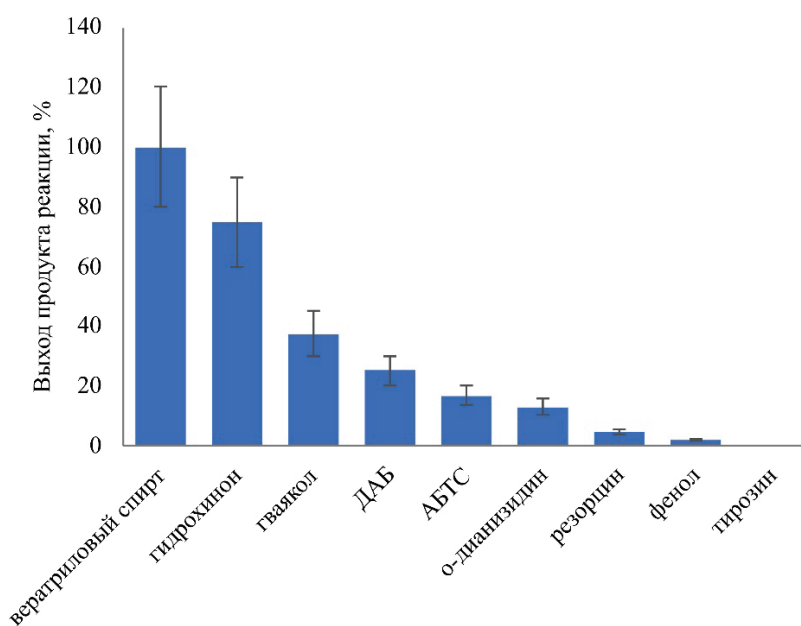


Рисунок 3. Выход продуктов реакций, отражающих эффективность окисления ароматических субстратов внеклеточной оксидазой из базидиомицета *N. nambi*. Данные нормированы на значение максимального выхода продукта в ряду измерений

В исследованиях с использованием в качестве субстратов выбранных ароматических соединений (табл. 1) была проведена сравнительная оценка субстратной специфичности внеклеточной оксидазы из базидиомицета *N. nambi* с широко применяемыми в биомедицинских приложениях ферментами лакказы и пероксидазы [3,8,23]. Для экспериментов использовали высокочистые ферменты, производимые фирмой «Sigma» (США) – лакказу из гриба *Agaricus bisporus* и пероксидазу из корней хрена (HRP). Как показали исследования, в субстратной специфичности к ароматическим соединениям у всех ферментов наблюдаются значительные различия (рис. 4). Из представленных данных следует, что лакказа из гриба *A. bisporus* с наибольшей эффективностью окисляет только двухатомный фенол резорцин. В значительно меньшей степени фермент проявляет активность с монофенолом и не катализирует окисление вератрилового спирта и двухатомных фенолов гидрохинона и гваякола. В то же время, субстратная специфичность HRP гораздо шире и по этому показателю она сопоставима

Таблица 2. Кинетические характеристики ферментативных реакций, отражающие каталитическую эффективность внеклеточной оксидазы гриба *N. nambi* при окислении ароматических соединений

Модельный субстрат	K_m , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_m , с ⁻¹ мМ ⁻¹
Вератриловый спирт	0,52	97	186
Гидрохинон	0,67	88	132
Гваякол	0,72	47	65

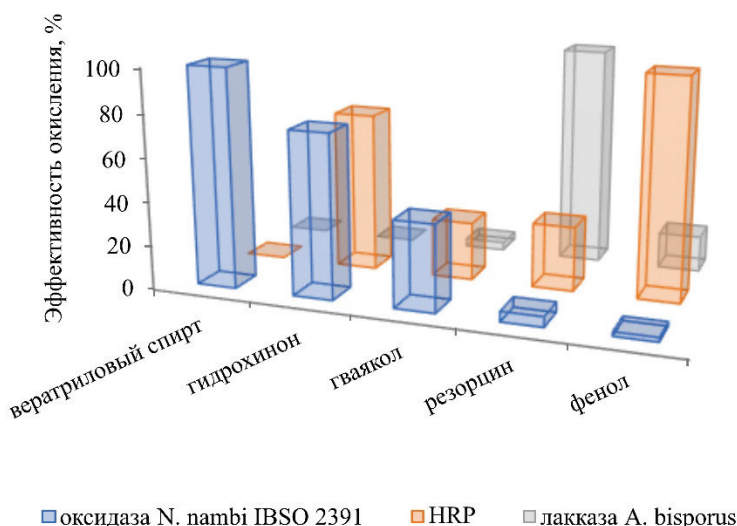


Рисунок 4. Эффективность окисления ароматических соединений внеклеточной оксидазой из гриба *N. nambi*, лакказы из гриба *A. bisporus* и пероксидазой из корней хрена (HRP). Данные нормированы на значения максимальных выходов продуктов в рядах измерений

с внеклеточной оксидазой из гриба *N. nambi*, однако у этих ферментов наблюдаются заметные различия в эффективности окисления ряда субстратов (рис. 4). При этом следует отметить также, что HRP катализировала окисление ароматических соединений только после добавки в реакционную смесь пероксида водорода, а внеклеточная оксидаза из гриба *N. nambi* проявляла высокую каталитическую активность без добавления этого медиатора.

В дополнительных экспериментах упомянутые выше коммерческие ферменты были использованы для выяснения того, является ли оксидаза из базидиомицета *N. nambi* металл содержащим ферментом. Поскольку в структуре лакказы и HRP содержатся ионы меди и железа, соответственно, была проведена оценка их каталитической активности после обработки хелатором двухвалентных ионов металлов ЭДТА и SH реагентом ДТТ. Было показано, что инкубация обоих ферментов с данными реагентами при их концентрациях 0,1-1 мМ приводила к значительной утрате их функциональной активности и снижению эффективности образования продуктов реакций до единиц или долей процентов, по сравнению с контролем (без обработки ЭДТА и ДТТ). В то же время, было установлено, что аналогичная обработка ЭДТА внеклеточной оксидазы из гриба *N. nambi* не оказывала влияния на функциональную активность фермента. Это может свидетельствовать об отсутствии двухвалентных ионов металлов в молекуле данного фермента. Кроме того, при обработке изучаемой оксидазы ДТТ наблюдалось значительное (на 20-25% и более) увеличение ее каталитической эффективности, по сравнению с контролем. Механизм этого феномена пока непонятен и требует отдельного исследования.

Таким образом, совокупность полученных в проведенных исследованиях результатов свидетельствует о том, что внеклеточная оксидаза из базидиомицета *N. nambi* функционирует в широких интервалах температур и pH реакционной среды, проявляя наибольшую каталитическую эффективность при нейтральных и слабощелочных условиях и температурах от 22 до 35 °C; катализирует окисление широкого спектра ароматических соединений без добавления дополнительных медиаторов (в частности, пероксида водорода); не содержит в своей структуре хромофорных соединений и ионов двухвалентных металлов. Это создает предпосылки для получения данной оксидазы в гомогенном виде для установления ее структуры и механизма каталитической функции и изучения применимости фермента в биомедицинской аналитике.

Исследования выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 0287-2021-0016).

Список литературы / References:

1. Zhang D., Gersberg R.M., Ng W.J., Tan S.K. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environmental Pollution*, 2014, vol. 184, doi: 10.1016/j.envpol.2013.09.009.
2. Wang X., Yao B., Su X. Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19, doi: 10.3390/ijms19113373.
3. Morsi R., Bilal M., Iqbal H.M.N., Ashraf S.S. Laccases and peroxidases: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants. *Science of The Total Environment*, 2020, vol. 714, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136572.
4. Savino S., Fraaije M.W. The vast repertoire of carbohydrate oxidases: An overview. *Biotechnology advances*, 2021, vol. 51, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107634.

5. Sousa A.C., Martins L.O., Robalo M.P. Laccases: Versatile biocatalysts for the synthesis of heterocyclic cores. *Molecules*, 2021, vol. 26, doi: 10.3390/molecules26123719.
6. Martinkova L., Kotik M., Markova E., Homolka L. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. *Chemosphere*, 2016, vol. 149, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.01.022.
7. Martinez A.T., Ruiz-Duenas F.J., Camarero S. et al. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnology Advances*, 2017, vol. 35, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.06.003.
8. Li F., Ma W., Wu X., Wang Y., He J. Luminol, horseradish peroxidase, and glucose oxidase ternary functionalized graphene oxide for ultrasensitive glucose sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, vol. 410, doi: 10.1007/s00216-017-0752-5.
9. Nikolavits E., Dimarogona M., Karagiannaki I., Chalima A., Fishman A., Topakas E. Versatile fungal polyphenol oxidase with chlorophenol bioremediation potential: characterization and protein engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, vol. 84, doi: 10.1128/AEM.01628-18.
10. Tu T., Wang Y., Huang H., Wang Y., Jiang X., Wang Z., Yao B., Luo H. Improving the thermostability and catalytic efficiency of glucose oxidase from *Aspergillus niger* by molecular evolution. *Food Chemistry*, 2019, vol. 281, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.099.
11. Jankowski N., Koschorreck K., Urlacher V.B. High-level expression of aryl-alcohol oxidase 2 from *Pleurotus eryngii* in *Pichia pastoris* for production of fragrances and bioactive precursors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, vol. 104, doi: 10.1007/s00253-020-10878-4.
12. Shebanova A.D., Chernykh A.M., Baskunov B.P., Gaidina A.S., Myasoedova N.M., Renfeld Z.V., Ponamoreva O.N., Kolomytseva M.P. Novel biocatalyst from *Microthielavia ovispora* VKM F-1735 for industrial dye decolorization in the absence of mediators. *Process Biochemistry*, 2021, vol. 109, doi: 10.1016/j.procbio.2021.07.009.
13. Tamaru Y., Umezawa K., Yoshida M. Characterization of an aryl-alcohol oxidase from the plant saprophytic basidiomycete *Coprinopsis cinerea* with broad substrate specificity against aromatic alcohols. *Biotechnology Letters*, 2018, vol. 40, no. 7, doi: 10.1007/s10529-018-2534-3.
14. Wang N., Ren K., Jia R., Chen W., Sun R. Expression of a fungal manganese peroxidase in *Escherichia coli*: a comparison between the soluble and refolded enzymes. *BMC Biotechnology*, 2016, vol. 16, no. 87, doi: 10.1186/s12896-016-0317-2.
15. Zdarta J., Meyer A.S., Jesionowski T., Pinelo M. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: a comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2018, vol. 258, doi: 10.1016/j.cis.2018.07.004.
16. Athamneh K., Alneyadi A., Alsadik A., Wong T.S., Ashraf S.S. Efficient degradation of various emerging pollutants by wild type and evolved fungal DyP4 peroxidases. *PLOS ONE*, 2022, vol. 17, doi: 10.1371/journal.pone.0262492.
17. Liu X., Deng W., Yang Y. Characterization of a novel laccase LAC-Yang1 from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* strain Yang1 with a strong ability to degrade and detoxify chlorophenols. *Molecules*, 2021, vol. 26, doi: 10.3390/molecules26020473.
18. Cleveland M., Lafond M., Xia F.R., Chung R., Mulyk P., Hein J.E., Brumer H. Two *Fusarium* copper radical oxidases with high activity on aryl alcohols. *Biotechnology and Biofuels*, 2021, vol. 14, doi: 10.1186/s13068-021-01984-0.
19. Kimani V., Ullrich R., Buttner E., Herzog R., Kellner H., Jehmlich N., Hofrichter M., Liers K. First Dye-decolorizing peroxidase from an ascomycetous fungus secreted by *Xylaria grammica*. *Biomolecules*, 2021, vol. 11, doi: 10.3390/biom11091391.
20. Ferreira P., Carro J., Balcells B., Martinez A.T., Serrano A. Expanding the physiological role of aryl-alcohol flavooxidases as quinone reductases. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, vol. 89, doi: 10.1128/aem.01844-22.
21. Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Mogilnaya O.A., Bondar V.S. Extracellular oxidases of basidiomycete *Neonothopanus nambi*: isolation and some properties. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2020, vol. 490, no. 1, doi: 10.1134/S1607672920010135.
22. Mogilnaya O., Ronzhin N., Posokhina E., Bondar V. Extracellular oxidase from the *Neonothopanus nambi* fungus as a promising enzyme for analytical applications. *The Protein Journal*, 2021, vol. 40, no. 5, doi: 10.1007/s10930-021-10010-z.
23. Maryskova M., Linhartova L., Novotny V., Rysova M., Cajthaml T., Sevcu A. Laccase and horseradish peroxidase for green treatment of phenolic micropollutants in real drinking water and wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, vol. 28, doi: 10.1007/s11356-021-12910-0.

ON THE SUBSTRATE SPECIFICITY AND SOME PROPERTIES OF THE EXTRACELLULAR OXIDASE FROM THE *NEONOTHOPANUS NAMBI* BASIDIOMYCETE**Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Bondar V.S.**

Institute of Biophysics FRC KSC SB RAS

Akademgorodok str., 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: ol_mog@mail.ru

Received 07.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpcc.2023.0591

Abstract. An extracellular enzyme with oxidase activity was isolated from the mycelium of the higher fungus *Neonothopanus nambi* by mild treatment of the biomass with β -glucosidase. A substrate specificity and some properties of the isolated extracellular oxidase were studied in the present work. Experiments revealed that the extracellular oxidase exhibited activity with most phenolic compounds chosen as model substrates. It is important to note that the enzyme exhibited a catalytic function in the reactions without the addition of exogenous hydrogen peroxide and other mediators. The highest catalytic activity of the enzyme was observed with veratryl alcohol and dihydric phenols, hydroquinone and guaiacol. The enzyme showed lower activity with aromatic azo compounds (ABTS, DAB, o-dianisidine). In reactions with dihydric phenol resorcinol and monophenol, the enzyme efficiency was extremely low. The kinetic parameters of the enzymatic reactions with actively oxidized substrates were determined. The addition of a divalent metal ion chelator (EDTA) did not affect the activity of the enzyme, while the addition of the SH reagent (DTT) increased the catalytic efficiency of the studied oxidase. The totality of the data obtained indicates that the extracellular oxidase of the *N. nambi* fungus catalyzes the oxidation of a wide range of aromatic compounds under slightly acidic and neutral conditions without the addition of additional mediators (in particular, hydrogen peroxide). This creates the prerequisites for studying the applicability of the enzyme in biomedical analytics.

Key words: higher fungi, basidiomycete *Neonothopanus nambi*, extracellular oxidase, veratryl alcohol, phenolic compounds.