

УДК 582.545(476):577.152.9:58(006)

СКРИНИНГ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ПАЛЬМОВЫХ УНИКАЛЬНОЙ КОЛЛЕКЦИИ ЦБС НАН БЕЛАРУСИ

¹Шугалей Н.А., ¹Мазец Ж.Э., ²Чертович В.Н., ²Спиридович Е.В.

¹БГПУ имени М. Танка, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Советская, 18

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова, 2в, spiridovich@cbg.basnet.by

Screening of peroxidase activity of Palm Family representatives of the unique collection of Central Botanical Garden of the NAS of Belarus

¹Shugaley N.A., ¹Mazetz Zh.E., ²Tchertowitch V.N., ²Spiridovich E.V.

BSPU named after M. Tank, Republic of Belarus, Sovetskaya, 18

*Central Botanical Garden of the NAS of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus, Surganova, 2v, spiridovich@cbg.basnet.by

Screening of peroxidase activity of 26 Palm Family representatives has been carried out. Peroxidase activity varies in the leaves of different species. The highest activity of peroxidase was obtained in the leaves of *Trachycarpus fortunei*, *Trachycarpus excelsa*, *Cariota cereus*, *Ptychosperma elegans*, *Butia capitata* and *Chamaedorea oblongata*. Isoenzyme specters of the palm peroxidases have also been studied.

Введение. Пероксидаза (КФ 1.11.1.7 донор: H₂O₂-оксидоредуктаза) – один из ключевых ферментов, контролирующих рост растений, их дифференциацию и развитие. В настоящее время пероксидаза нашла свое практическое использование. Наиболее широкое применение пероксидаза получила в биоаналитических методах – иммуноферментном анализе и электрохимических биосенсорах. Этот фермент используют при синтезе и трансформации органических молекул, для удаления из промышленных вод ароматических аминов и фенолов, для обесцвечивания промышленных красителей в текстильной и бумажной промышленности и др. процессах [3, 4].

Основным источником коммерчески доступной пероксидазы являются корни хрена (*Armoracia rusticana*). Однако необходимость иметь пероксидазы с различной субстратной специфичностью и более высокой термо- и рН-стабильностью стимулировала поиск и изучение новых пероксидаз растений и грибов.

При скрининге тропических растений было обнаружено, что листья некоторых видов пальм содержат высокий уровень пероксидазной активности. Показано, что пероксидазы пальм обладают уникально высокой стабильностью при кислотных и щелочных условиях и при повышенных температурах. Более того, эти ферменты по сравнению с другими пероксидазами более стабильны в отношении пероксида водорода. Благодаря их высокой стабильности пероксидазы пальм были успешно применены при разработке новых биоаналитических тестов, конструировании биосенсоров с улучшенными характеристиками и синтезе полимеров [3].

В связи с этим целью настоящей работы является определение пероксидазной активности и изучение отдельных биохимических характеристик пероксидаз у представителей сем. Пальмовых уникальной коллекции ЦБС НАН Беларуси.

В данной работе впервые была исследована пероксидазная активность и изоферментные спектры пероксидаз у представителей сем. Пальмовых коллекции ЦБС НАН Беларуси.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служили листья исследуемых пальм. Crude-экстракты получали путем измельчения мелко нарезанных листьев в гомогенизаторе марки MPW-302 (MECHANICA PRECYZYNA, Польша). Для экстракции использовали 10 мМ фосфатный буфер, pH 7,0. Соотношение массы навески к объему буфера для всех образцов было одинаковым (1 к 6,7). Гомогенаты отжимали и центрифугировали при 8000 об/мин. и температуре 0-4 °С в течение 10 мин. Супернатант (crude-экстракт) сливали и использовали для последующих измерений. Определение пероксидазной активности проводили по реакции, предложенной Триндером [8]. В качестве субстрата использовали смесь фенола с 4-аминоантипирином со следующей концентрацией компонентов в реакционной смеси: фенол – 80,42 ммоль/л, 4-ААП – 1,148 ммоль/л, пероксид водорода – 0,85 ммоль/л, и коэффициентом молярной экстинкции окрашенного продукта реакции при $\lambda = 510$ нм равным $6,58 \text{ ммоль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и длине оптического пути 1 см. Концентрацию белка в образцах определяли по методу Брэдфорд [7]. Все измерения проводились на спектрофотометре SOLAR PV 1251С (Беларусь, Минск) при 37 °С. Электрофоретическое разделение изопероксидаз проводили методом вертикального электрофореза в 6 % полиакриламидном геле в анодной буферной системе Девиса (система 1 по Мауреру [1]). Активность пероксидаз в гелях обнаруживали бензидиновым методом по прописи Сафонова и Сафоновой [2] в модификации Чайновой и Хавкина [6]. Перед окрашиванием гели 10-20 минут промывали ледяным 0,1 М ацетатным буфером pH 4,5-5,0 [5].

Результаты и их обсуждение. Исследования проводились на базе отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси. Всего было исследовано 26 видов пальм.

В результате проведенного скрининга выявлено, что листья исследуемых представителей пальмовых сильно различаются по уровню пероксидазной активности. Наибольшая активность пероксидазы (Е/г сырья) наблюдалась в листьях *Trachycarpus fortunei*, *Trachycarpus excelsa*, *Cariota cereus*, *Ptychosperma elegans*, *Butia capitata*, а наименьшая – в листьях *Washingtonia filifera*, *Howea forsteriana*, представителей рода *Phoenix*. Отмечаются заметные различия и в содержании белка в навеске исследуемых образцов. В целом можно говорить о наличии положительной корреляции между уровнем пероксидазной активности и концентрацией белка. Вследствие этого значения удельной активности пероксидазы (Е/мг белка) для исследуемых представителей варьировали в значительно меньшей степени по сравнению со значениями общей пероксидазной активности в пересчете на единицу массы сырья (рис. 1).

Анализ полученных нами электрофореграмм изопероксидаз листьев пальм показал высокую степень гетерогенности исследуемых представителей семейства Пальмовых по изоферментным спектрам пероксидаз. В различных образцах выявлено от 2 до 6 зон пероксидазной активности. Характерно, что в основном изоферменты пероксидазы имели низкую и среднюю подвижность. Значения относительной электрофоретической подвижности (ОЭП) зон пероксидазной активности всех образцов находились в пределах 0,06 – 0,46. Для большинства исследуемых образцов характерны медленные зоны пероксидазной активности с ОЭП 0,1 – 0,22.

Таким образом, в результате скрининга пероксидазной активности среди представителей семейства Пальмовых уникальной коллекции ЦБС НАН Беларуси были выявлены виды (*Trachycarpus fortunei*, *Trachycarpus excelsa*, *Cariota cereus*, *Ptychosperma elegans*, *Butia*

capitata, *Chamaedorea oblongata*), отличающиеся высокой активностью фермента пероксидазы. Показано, что уровень пероксидазной активности и изоферментный состав являются специфическими признаками для каждого вида пальм.

Литература

1. Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. М.: Мир, 1971. 247 с.
2. Сафонов В. И., Сафонова М. П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле //Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 113-119.
3. Сахаров И. Ю. Пероксидазы пальм //Биохимия. 2004. Т.69, № 8 С. 1013 – 1020.
4. Сахаров И. Ю., Весга Бланко М. К., Сахарова И. В. Субстратная специфичность пероксидазы африканской масличной пальмы //Биохимия. 2002.Т. 67, № 9 С. 1259 – 1264.
5. Хавкин Э. Е., Забродина М. В. Наследуемые изменения в спектрах пероксидаз и эстераз у самоклонов кукурузы //Физиология растений. 1994. Т. 41, № 6 С. 859 – 867.
6. Чаянова С. С., Хавкин Э. Е. Использование нейтрального полиакриламидного геля для изоферментного анализа пероксидаз и эстераз //Физиология растений.1990.Т. 37, № 5 С. 1036 – 1039.
7. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding //Annal. Biochem. 1976. Vol.72 P. 248 – 254.
8. Trinder P. Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor //Ann. Clin. Biochem. 1969. Vol. 24, № 6.