

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНОСТИ И КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ПЕРОКСИДАЗ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ПАЛЬМОВЫХ КОЛЛЕКЦИИ ЦБС НАН БЕЛАРУСИ

Введение. Пероксидаза (КФ 1.11.1.7 донор: H_2O_2 -оксидоредуктаза) – один из наиболее распространенных растительных ферментов. По своей природе пероксидаза является гем-содержащим гликопротеидом. Основная функция пероксидазы – катализировать окисление химических соединений за счет кислорода пероксида водорода с образованием промежуточных комплексов, обладающих различными спектральными характеристиками. К субстратам, окисляемым пероксидазой в присутствии пероксида водорода, относятся большинство фенолов (пирокатехин, пирогаллол, гидрохинон, резорцин, гваякол), а также бензидин, анилин, *n*-толуидин, ароматические кислоты (бензойная, салициловая, галловая), аскорбиновая кислота, нитриты и ряд других соединений. Пероксидаза обладает не только пероксидазными, но и оксидазными свойствами, катализируя окисление целого ряда соединений за счет неактивированного молекулярного кислорода. Оксидазными субстратами пероксидазы могут быть гидро-, нафтохиноны, индолилуксусная кислота, НАДН, НАДФН, флороглюцин, диоксифумаровая кислота, глутатион и др. [1–4].

Наличие большого числа изоферментов, разнообразие механизмов действия фермента, способность катализировать реакции пероксидазного и оксидазного окисления субстратов обуславливают способность пероксидазы выполнять самые разнообразные функции в живых организмах [1; 3].

Пероксидаза – один из ключевых ферментов, контролирующих рост растений, их дифференциацию и развитие. Этот фермент участвует в формировании, реологии и лигнификации клеточных стенок, биосинтезе этилена, метаболизме индолил-3-уксусной кислоты, дыхании растений, защите тканей от поражения и инфекции патогенными микроорганизмами [1; 4–6].

В настоящее время пероксидаза нашла свое практическое использование. Наиболее

широкое применение пероксидаза получила в биоаналитических методах – иммуноферментном анализе как соединение, маркирующее молекулы антител и антигенов, и электрохимических биосенсорах, при конструировании ферментных электродов. Этот энзим может быть также использован для удаления из промышленных вод ароматических аминов и фенолов, включая хлорзамещенные фенолы, для обесцвечивания промышленных красителей в текстильной и бумажной промышленности, в тонком органическом синтезе низко- и высокомолекулярных соединений и др. Кроме того, пероксидазы играют важную роль в процессе приготовления и хранения многих пищевых продуктов [3–5; 7].

Хотя пероксидазы обнаруживаются в тканях практически всех растений, в настоящее время основным источником коммерчески доступного фермента являются корни хрена (*Armoracia rusticana*) [4]. В то же время появление пероксидаз с повышенной стабильностью и отличной субстратной специфичностью могло бы повысить качество иммуноферментных наборов и стимулировать разработку новых аналитических методов и промышленных процессов. В настоящее время проводятся многочисленные исследования пероксидаз из новых источников. Появились работы, посвященные выделению и исследованию свойств пероксидаз сои, табака, арахиса, люцерны и других растений и грибов [7–8]. К препаратам пероксидаз, появившимся на рынке в последние годы, относятся: грибная пероксидаза *Coprinus cinereus* (старое название *Arthromyces ramosus*), производимая в коммерческих масштабах в нативной и рекомбинантной формах, пероксидаза из отходов производства соевых бобов и пероксидаза из суперпродуцирующей культуры клеток батата [2].

Следует отметить, что при скрининге тропических растений была обнаружена высокая активность пероксидазы в листьях некоторых

видов пальм. При этом отмечается, что уровень пероксидазной активности не зависит от возраста пальм и остается неизменным в течение всего годового цикла. Таким образом, пероксидазы пальм являются конструктивным ферментом для этих растений [8].

Показано, что пероксидазы пальм обладают уникально высокой стабильностью при кислотных и щелочных условиях и при повышенных температурах. Кроме того, эти ферменты, по сравнению с другими пероксидазами, более стабильны в отношении пероксида водорода. Благодаря их высокой стабильности, пероксидазы, выделенные из листьев королевской и африканской масличной пальм, были успешно применены при разработке новых биоаналитических тестов, конструировании биосенсоров с улучшенными характеристиками и синтезе полимеров [8–10].

С целью выявления возможности выделения и практического применения пероксидаз нами был проведен скрининг пероксидазной активности из листьев представителей семейства Пальмовых уникальной коллекции ЦБС НАН Беларуси. В область задач настоящего исследования (помимо определения общей и удельной активности пероксидазы) входило также изучение изоферментного состава пероксидаз и электрофоретических спектров растворимых белков, экстрагированных из листьев исследуемых видов пальм.

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, рН 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. Полученную после центрифугирования надосадочную жидкость использовали для определения пероксидазной активности и концентрации белка. Определение проводили по реакции, предложенной Триндером [11]. В качестве субстрата при определении пероксидазной активности 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 $6,58 \text{ ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и длине оптического пути 1 см. Концентрацию белка в образцах определяли по методу Брэдфорд [12]. Все измере-

ния проводились на спектрофотометре SOLAR PV 1251С (Беларусь, Минск) при 37 °С.

Электрофоретическое разделение изопероксидаз проводили методом вертикального электрофореза в 6% полиакриламидном геле (ПААГ) в анодной буферной системе Девиса (система 1 по Мауреру [13]). Активность пероксидаз в гелях обнаруживали бензидиновым методом по прописи Сафонова и Сафоновой [14] в модификации Чаяновой и Хавкина [15]. Перед окрашиванием гели 10–20 мин. промывали ледяным 0,1 М ацетатным буфером рН 4,5–5,0 [16].

Фракции растворимых белков анализировали методом вертикального электрофореза в 12% ПААГ в щелочной системе с додецилсульфатом натрия (ДСН). Гели после электрофоретического разделения белков фиксировали в течение 4 часов в 15%-ном водном растворе трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Окрашивали гели раствором, содержащим 0,1% Кумасси R-250, 25% этилового спирта и 8% уксусной кислоты. В красящем растворе гели выдерживали в течение не менее 4 часов. В качестве отмывающего раствора использовали водный раствор, содержащий 25% этилового спирта и 8% уксусной кислоты [17].

Результаты и их обсуждение. Исследования проводились на базе отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси. Всего было исследовано 26 видов пальм. Результаты определения активности пероксидазы и содержания белка в экстрактах, полученных из листьев исследуемых растений, представлены в таблице.

Из результатов, приведенных в таблице, видно, что листья исследуемых видов пальм сильно различаются по уровню пероксидазной активности. Наибольшая активность пероксидазы (Е/г сырья) наблюдалась в листьях *Trachycarpus fortunei*, *Trachycarpus excelsa*, *Cariota urens*, *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 (рисунок 1).

Таблица – Активность пероксидазы у различных представителей сем. Пальмовых

| Представитель | Активность пероксидазы, Е/г сырья | Содержание белка, мг/г сырья | Удельная активность пероксидазы, Е/мг белка |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|---|
| <i>Trahycarpus fortunei</i> | 26,770 ± 1,752 | 6,147 ± 0,684 | 4,441 ± 0,225 |
| <i>Trahycarpus excelsa</i> | 22,090 ± 0,213 | 6,097 ± 0,333 | 3,634 ± 0,250 |
| <i>Washingtonia filifera</i> | 0,767 ± 0,035 | 0,180 ± 0,016 | 4,288 ± 0,416 |
| <i>Washingtonia robusta</i> | 4,981 ± 0,038 | 1,158 ± 0,025 | 4,301 ± 0,058 |
| <i>Sabal palmetto</i> | 7,443 ± 0,630 | 2,441 ± 0,154 | 3,076 ± 0,425 |
| <i>Chamaedorea elegans</i> | 8,358 ± 0,161 | 6,542 ± 0,279 | 1,279 ± 0,038 |
| <i>Chamaedorea concolor</i> | 4,965 ± 0,266 | 6,229 ± 0,077 | 0,797 ± 0,040 |
| <i>Chamaedorea oblongata</i> | 10,586 ± 0,332 | 0,458 ± 0,017 | 23,118 ± 0,582 |
| <i>Cariota urens</i> | 12,609 ± 0,685 | 7,649 ± 0,506 | 1,650 ± 0,048 |
| <i>Rhapis excelsa</i> | 1,619 ± 0,078 | 1,034 ± 0,068 | 1,569 ± 0,036 |
| <i>Livistona chinensis</i> | 3,809 ± 0,089 | 0,559 ± 0,054 | 6,918 ± 0,616 |
| <i>Livistona australis</i> | 4,235 ± 0,252 | 2,905 ± 0,017 | 1,457 ± 0,088 |
| <i>Livistona decipiens</i> | 3,566 ± 0,364 | 3,122 ± 0,057 | 1,141 ± 0,097 |
| <i>Archontophoenix alexandrae</i> | 6,354 ± 0,309 | 2,865 ± 0,024 | 2,218 ± 0,114 |
| <i>Butia capitata</i> | 10,281 ± 0,129 | 3,657 ± 0,363 | 2,843 ± 0,317 |
| <i>Ptychosperma elegans</i> | 12,575 ± 0,792 | 4,598 ± 0,248 | 2,734 ± 0,068 |
| <i>Phoenix reclinata</i> | 0,832 ± 0,035 | 0,636 ± 0,021 | 1,308 ± 0,033 |
| <i>Phoenix sylvestris</i> | 1,807 ± 0,039 | 0,646 ± 0,022 | 2,805 ± 0,073 |
| <i>Phoenix dactylifera</i> | 0,858 ± 0,016 | 2,172 ± 0,027 | 0,395 ± 0,007 |
| <i>Phoenix roebelenii</i> | 3,784 ± 0,222 | 1,921 ± 0,054 | 2,042 ± 0,113 |
| <i>Phoenix canariensis</i> | 0,501 ± 0,010 | 0,574 ± 0,021 | 0,875 ± 0,029 |
| <i>Coccothrinax argentea</i> | 5,184 ± 0,022 | 3,197 ± 0,039 | 1,622 ± 0,024 |
| <i>Trithrinax brasiliensis</i> | 2,621 ± 0,213 | 1,925 ± 0,099 | 1,363 ± 0,089 |
| <i>Chamaerops humilis</i> | 3,765 ± 0,088 | 1,105 ± 0,014 | 3,409 ± 0,048 |
| <i>Howea forsteriana</i> | 0,976 ± 0,040 | 0,288 ± 0,007 | 3,389 ± 0,033 |
| <i>Erythea armata</i> | 2,058 ± 0,178 | 1,479 ± 0,039 | 1,390 ± 0,095 |

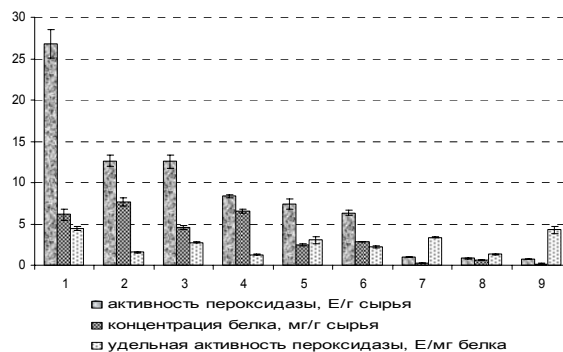


Рисунок 1 – Скрининг пероксидазной активности у представителей сем. Пальмовых

1 – *Trachycarpus fortunei*, 2 – *Cariota urens*, 3 – *Ptychosperma elegans*, 4 – *Chamaedorea elegans*, 5 – *Sabal palmetto*, 6 – *Archontophoenix alexandrae*, 7 – *Howea forsteriana*, 8 – *Phoenix reclinata*, 9 – *Washingtonia filifera*.

Следует отметить, что в пределах одного рода виды некоторых пальм (*Trachycarpus fortunei*, *Trachycarpus excelsa*) имели практически одинаковые значения как пероксидазной активности, так и концентрации белка. Однако виды других родов по этим показателям довольно сильно отличались между собой. Так, *Washingtonia filifera* и *Washingtonia robusta* резко различаются по активности пероксидазы и по количеству белка, но в то же время удельная активность пероксидазы у них практически одинакова. Виды в пределах родов *Livistona*, *Phoenix* и, особенно, *Chamaedorea* отличаются также и по удельной активности пероксидазы (таблица). Отсюда следует вывод, что уровень пероксидазной активности является высоко специфичным признаком для каждого вида пальм.

Анализ полученных нами электрофореграмм изопероксидаз листьев пальм показал высокую степень гетерогенности изоферментных спектров пероксидаз у исследуемых пред-

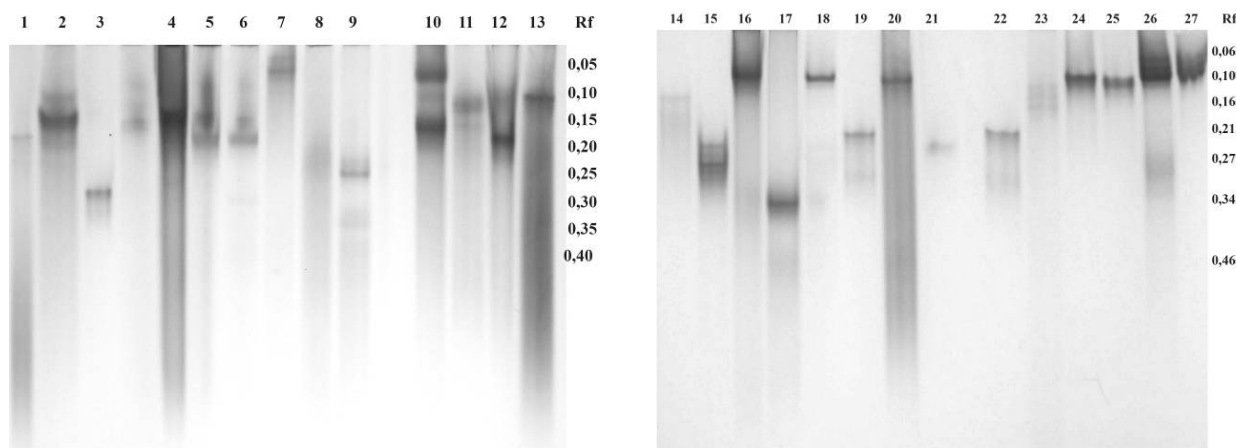


Рисунок 2 – Электрофореграммы изопероксидаз листьев пальм (нативный электрофорез в 6% ПААГ):

1 – *Ptychosperma elegans*, 2 – *Butia capitata*, 3 – *Archontophoenix alexandrae*, 4 – *Livistona chinensis*, 5 – *Washingtonia filifera*, 6 – *Chamaedorea concolor*, 7 – *Rhapis excelsa*, 8 – *Cariota urens*, 9 – *Chamaedorea elegans*, 10 – *Sabal palmetto*, 11 – *Washingtonia robusta*, 12 – *Washingtonia filifera*, 13 – *Trachycarpus fortunei*, 14 – *Erythea armata*, 15 – *Howea forsteriana*, 16 – *Chamaerops humilis*, 17 – *Chamaedorea oblongata*, 18 – *Phoenix canariensis*, 19 – *Trithrinax brasiliensis*, 20 – *Trachycarpus excelsa*, 21 – *Livistona decipiens*, 22 – *Livistona australis*, 23 – *Coccothrinax argentea*, 24 – *Phoenix roebelenii*, 25 – *Phoenix dactylifera*, 26 – *Phoenix sylvestris*, 27 – *Phoenix reclinata*.

ставителей сем. Пальмовых (рисунок 2). В различных образцах было 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 зоны пероксидазной активности с ОЭП 0,1–0,22.

Электрофоретическое разделение растворимых белков crude-экстрактов пальмовых листьев в денатурирующих условиях также показало высокую степень неоднородности исследуемых образцов. В различных образцах было выявлено до двадцати белковых фракций со значениями относительных молекулярных масс 8–174 кДа. Общим для спектров преобладающего большинства образцов оказалось наличие низкомолекулярных полипептидов со значениями молекулярных масс ~16–20 кДа. В то же время наиболее четкая гетерогенность образцов по ряду компонентов наблюдается в области ~35–65 кДа (проявляется до 9 компонентов). Наибольшее количество компонентов было выявлено в образцах экстрактов листьев следующих видов пальм: *Butia capitata* (18–20), *Phoenix canariensis* (16–17), *Livistona chinensis* (14), *Coccothrinax argentea* (13–14), *Sabal palmetto* (13).

Заключение. Таким образом, в результате скрининга, проведенного в рамках настоящего исследования, среди представителей сем. Пальмовых уникальной коллекции ЦБС НАН Беларуси были выявлены виды пальм, отличающиеся высокой активностью фермента пероксидазы (*Trachycarpus fortunei*, *Trachycarpus excelsa*, *Cariota urens*, *Ptychosperma elegans*, *Butia capitata*, *Chamaedorea oblongata*), что может служить исходным пунктом для дальнейших экспериментов по выделению фермента пероксидазы из данных растений. Показана также высокая степень гетерогенности исследуемых видов пальм по изоферментным спектрам пероксидаз и по электрофоретическим спектрам растворимых белков, экстрагированных из пальмовых листьев. Специфичность изоферментных спектров пероксидаз различных представителей пальм может быть положена в основу биохимической паспортизации ботанических коллекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева, В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений / В.А. Андреева. – М.: Наука, 1988. – 128 с.
2. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений / И. Г. Газарян [и др.] // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303–322.
3. Рогожин, В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В.В. Рогожин. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.
4. Veitch, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme / N.C. Veitch // *Phytochemistry*. – 2004. – Vol. 65. № 3 – P. 249–259.
5. Газарян, И. Г. Пероксидазы растений / И.Г. Газарян // Итоги науки и техники. Серия Биотехнология / ВИНТИ. – М., 1992. – Т. 36: Биотехнология пероксидаз растений и грибов. – С. 4–25.
6. Максимов, И.В. Про-/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам / И.В. Максимов, Е.А. Черепанова // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. № 3. – С. 250–261.
7. Субстратная специфичность пероксидазы африканской масличной пальмы / И.Ю. Сахаров [и др.] // *Биохимия*. – 2002. – Т. 67. № 9. – С. 1259 – 1264.
8. Сахаров, И.Ю. Пероксидазы пальм / И.Ю. Сахаров // *Биохимия*. – 2004. – Т. 69. № 8. – С. 1013–1020.
9. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf / S. S. Deepa [et al.] // *Phytochemistry*. – 2002. – Vol. 61. – P. 503–511.
10. Sakharov, I.Yu. Extremely high stability of African oil palm tree peroxidase / I.Yu. Sakharov, I.V. Sakharova // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2002. – Vol. 1598. № 1/2. – P. 108–114.
11. Trinder, P. Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor / P. Trinder // *Ann. Clin. Biochem.* – 1969. – Vol. 24. № 6.
12. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Annal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. № 1/2. – P. 248–254.
13. Маурер, Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле / Г. Маурер. – М.: Мир, 1971. – 247 с.
14. Сафонов, В.И. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле / В.И. Сафонов, М.П. Сафонова // *Биохимические методы в физиологии растений*. – М.: Наука, 1971. – С. 113–119.
15. Чайнова, С.С. Использование нейтрального полиакриламидного геля для изоферментного анализа пероксидаз и эстераз / С.С. Чайнова, Хавкин Э.Е. // *Физиология растений*. – 1990. – Т. 37. № 5. – С. 1036–1039.
16. Хавкин, Э.Е. Наследуемые изменения в спектрах пероксидаз и эстераз у самоклонов кукурузы / Э.Е. Хавкин, М.В. Забродина // *Физиология растений*. – 1994. – Т. 41. – № 6. – С. 859–867.
17. Электрокинетические явления в курсе биофизики: учеб.-метод. пособие / Ж.Э. Мазец [и др.]. – Минск: БГПУ, 2000. – 41 с.

SUMMARY

Screening of peroxidase activity of 26 Palm Family representatives has been carried out. It is shown that peroxidase activity varies in the leaves of different species. In some palms a high enough peroxidase activity was revealed. Electrophoresis of soluble proteins extracted from palm leaves under denatured conditions has been also carried out. Isoenzyme specters of the palm peroxidases have been studied and characterized. The obtained results revealed a high degree of heterogeneity of different palm species as far as the isoperoxidase specters and polypeptide composition of soluble proteins are concerned.