

В. Н. Леонтьев, доцент; И. М. Бурак ассистент; Т. И. Ахрамович ассистент; В. В. Москва студент;
В. В. Титок, гл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПЕРОКСИДАЗ ИЗ СТЕБЛЕЙ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА

In this article results of the analysis of peroxidases activity on three substrats *o*-dianyzidine, guaiacol and conyferyl alcohole are submitted in stalks of flax of six grades at stages «fast grows» and «early yellow ripeness». The opportunity of application spectrophotometric method of definition peroxidases activity for identification of grades and high quality forecasting of a fiber for a flax is shown.

Пероксидаза является гемсодержащим ферментом, катализирующим реакции окисления различных субстратов по пероксидазному типу (при помощи пероксида водорода) либо по оксидазному типу (за счет молекулярного кислорода). Фермент выполняет большое количество разнообразных функций, причем интенсивность аэробных процессов в живых организмах оценивается по активности пероксидазы, которая совместно с супероксиддисмутазой и каталазой является основным ферментом антиоксидантной защиты клетки от разрушительного действия активных форм кислорода [1].

Существует множество изоформ пероксидаз: катионные, анионные, щелочные, кислые, нейтральные, различающиеся по субстратной специфичности, активности, локализации и другим свойствам. Пероксидаза является индуцибельным ферментом, она реагирует на самые разнообразные воздействия, либо изменяя при этом набор своих изоэнзимов, либо повышая активность уже присутствующих молекулярных форм. Функции пероксидазы в растениях многообразны, она участвует в фотосинтезе и дыхании; проявляет противомикробное действие; повышает устойчивость растений к стрессам; участвует в механизме дезинтоксикации; участвует в биосинтезе лигнина.

Для льна-долгунца принято различать шесть основных фаз роста: всходы, елочка, быстрый рост, бутонизация, цветение, созревание. Стадия созревания включает три степени: зеленую, раннюю желтую и желтую полную спелость.

На стадии быстрого роста прирост растений в высоту достигает 4 см в сутки, образуется до 75% сухих веществ и 60% волокна (целлюлозы). В это время происходит реализация потенциальных возможностей роста стебля растений.

Пероксидазная активность в стеблях льна-долгунца является одним из биохимических маркеров при отборе генотипов-доноров высокого качества и продуктивности льна. Повышенная пероксидазная активность на данных стадиях развития может быть связана с усиленной лигнификацией растущего стебля льна, что можно с точки зрения отбора сортов, устойчивых к полеганию.

Можно определять как общую активность пероксидаз по универсальному субстрату для всех пероксидаз – орто-дианизидину, так и специфическую активность по гваяколу и кониферилловому спирту, являющимся мономерами – предшественниками лигнина.

В качестве объекта исследования использовали среднюю часть стеблей льна-долгунца из растений, отобранных на различных стадиях онтогенеза (стадия быстрого роста, стадия ранней желтой спелости). Растения льна-долгунца шести сортов были выращены в фитотроне Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Их технические характеристики представлены в табл. 1.

Отобранный растительный материал гомогенизировали, и экстракцию пероксидаз из гомогената осуществляли 0,02 М трис-ацетатным буферным раствором с pH 7,0 [2]. Для ингибирования протеолитических ферментов применяли фенолметилсульфонилфторид (PMSF). В работе использован кинетический спектрофотометрический метод, основанный на определении начальной скорости ферментативной реакции окисления субстратов перекисью водорода [3]. Для выбора оптимальных условий протекания ферментативной реакции определяли влияние pH, концентраций белка, перекиси водорода и каждого субстрата на пероксидазную активность. Результаты представлены в табл. 2. Активности пероксидаз, определенные для трех субстратов в стеблях шести разных сортов, взятых на стадиях быстрого роста и ранней желтой спелости, представлены в табл. 3.

Из представленных результатов видно, что для большинства сортов пероксидазная активность по всем трем субстратам на стадии «ранняя желтая спелость» выше активности на стадии «быстрый рост». Исключение составляют сорта Криста и Батист, которые отличаются наибольшим выходом волокна (табл. 1). Мы полагаем, что это обусловлено различной направленностью метаболических процессов, на данных стадиях роста. На стадии «быстрый рост» происходит интенсивный синтез целлюлозы, т. е. реализуется потенциальная возможность роста стебля растения и происходит формирование основной части его целлюлозного каркаса.

Технические характеристики сортов льна-долгунца

Сорт	Техническая длина, см	Сухая масса стебля, г	Содержание волокна, %
Криста	55,20	0,62	35,94
К-6307	51,70	0,51	21,87
Батист	86,30	0,96	30,73
Лазер	57,70	0,78	22,36
Виера	50,50	0,39	30,53
Фортуна	72,00	1,03	29,85

Таблица 2

Оптимальные условия для определения пероксидазной активности

Субстрат пероксидазного окисления	Концентрация белка, мкг/мл	Концентрация окисляемого субстрата, мМ	Концентрация перекиси водорода, мМ	pH
Орто-дианизидин	70	0,1	0,7	6
Гваякол	70	15	10	6
Кониферилловый спирт	50	0,09	1,25	6

Таблица 3

Активность пероксидаз разных сортов льна-долгунца на стадиях «быстрый рост» и «ранняя желтая спелость», мкмоль/(мг · мин)

Сорт льна	Субстрат					
	Орто-дианизидин		Гваякол		Кониферилловый спирт	
	Быстрый рост	Ранняя желтая спелость	Быстрый рост	Ранняя желтая спелость	Быстрый рост	Ранняя желтая спелость
Криста	0,323	0,136	0,288	1,657	0,543	—
К-6307	0,275	1,104	1,725	5,249	0,443	1,084
Батист	0,311	0,171	1,483	1,588	1,012	0,383
Лазер	0,539	0,619	0,778	8,657	0,265	1,537
Виера	0,390	0,593	0,845	5,336	0,237	0,760
Фортуна	0,239	0,332	1,160	2,534	0,776	0,698

На стадии «ранняя желтая спелость», напротив, протекает интенсивный биосинтез лигнинов, предшественниками которых и являются гваякол и кониферилловый спирт. Более высокая общая пероксидазная активность обусловлена повышенным удельным содержанием гваякола и кониферилловый спирт-зависимых пероксидаз на этой стадии.

Таким образом, проведенные нами исследования однозначно говорят о возможности применения кинетического спектрофотометрического метода определения пероксидазной активности в стеблях льна на разных стадиях роста для идентификации сортов и прогнозирования высокого качества волокна для льна-долгунца.

Литература

1. Рогожин В. В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.
2. Effects of cadmium and copper on peroxidase, NADH oxidase and IAA oxidase activities in cellwall, soluble and microsomal membrane fractions of pea roots / Abdelilah Chaoui, Brahim Jarrar, Ezzedine EL Ferjani // Journal of Plant Physiology. – 2004. – № 161. – P. 1225–1234.
3. Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. Кинетическое изучение реакции окисления *o*-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена // Биохимия. – 1977. – Т. 42. – № 8. – С. 1372–1379.