

ORIGINAL ARTICLE

Dependence of Guaiacol Peroxidase Activity on pH in Official Plant Leaves

M.A. Zhivetyev, I.A. Graskova, V.K. Voinikov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

*E-Mail: nik.19@mail.ru

Received October 30, 2012

For the first time, the guaiacol peroxidase activity have been studied by different pH in lamina of *Achillea asiatica* Serg., *Veronica chamaedrys* L., *Taraxacum officinale* Wigg., *Alchemilla subcrenata* Buser.

Key words: peroxidase, officinal plants, pH

ORIGINAL ARTICLE

Зависимость Активности Гваякол Peroксидазы от pH в Листьях Лекарственных Растений

Живетьев М.А., Граскова И.А., Войников В.К.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений, Иркутск.

*E-Mail: nik.19@mail.ru

Поступила в редакцию 30 октября 2012 г.

Впервые была изучена активность гваякол пероксидаз при разных значениях pH в листовых пластинках *Achillea asiatica* Serg., *Veronica chamaedrys* L., *Taraxacum officinale* Wigg., *Alchemilla subcrenata* Buser.

Key words: peroxidase, officinal plants, pH

Пероксидаза – фермент, обладающий выраженным полиморфизмом. Наличие множества изоформ этого фермента позволяет ему работать в разных условиях и выполнять разную функциональную нагрузку (Граскова и др., 2002). Изменения активности, изоферментного спектра и термостабильности пероксидазы отмечают при различных биологических, физических и химических воздействиях на растения (Андреева и др., 1979; Карпец и др., 2009).

Активность пероксидазы зависит от pH, температуры, концентраций субстрата и самого фермента (Kareska, 2009). Известно, что на перикарпе китайской сливы максимальная активность пероксидазы наблюдается при pH 6,5 и 70 °C, а полифенолоксидазы при pH 6,5–6,75 и 20 °C (Mizobutsi et al., 2010). Susan Kareska (2009) показано, что максимум активности

пероксидазы приходится на pH 7, а минимум на 4. Zolfaghari с соавторами (2010) на букке (*Fagus orientalis*) показали увеличение активности пероксидазы от июля к сентябрю при отсутствии роста активности каталазы. В то же время считается общепринятой взаимосвязь резистентности растительных тканей к различным тепловым воздействиям и активностью ферментов, обладающих пероксидазной активностью (Müftlülçil, 1985; Thongsook, Barrett, 2005).

В этой связи, целью наших исследований было изучить активность гваякол пероксидаз в листьях вероники дубравной, тысячелистника азиатского, одуванчика лекарственного и манжетки городковатой, произрастающих на побережье озера Байкал, в разные сроки вегетационного периода в зависимости от pH в реакционной смеси.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования. Исследовались листья тысячелистника азиатского *Achillea asiatica* Serg., вероники дубравной *Veronica chamaedrys* L., одуванчика лекарственного *Taraxacum officinale* Wigg., манжетки городковатой *Alchemilla subcrenata* Buser, собранных в течение вегетационного периода 2008 года на территории стационара «Речка Выдринная» в июле, августе и сентябре.

Выделение гваякол пероксидаз. Навеску (1 г) ткани помещали в 10 мл холодного цитратно-фосфатного буфера и растирали в фарфоровой ступке при 4 °С (Паду, 1995). Полученный гомогенат центрифугировали при 3 тыс. об./мин. в течение 15 мин. Супернатант использовали для определения активности фермента.

Определение пероксидазной активности. Активность растворимых пероксидаз в листьях растений определяли по изменению оптической плотности (длина волны 580 нм) в реакционной смеси следующего состава: 0,5 мл 0,1 М цитратно-фосфатного буфера (рН от 4,0 до 7,0 с шагом 0,2), 0,5 мл 0,3 % перекиси водорода («Реахим», Россия), 0,5 мл 0,05 % гваякол (Sigma, США) и 0,5 мл пробы (1г пробы растирали в 10 мл Цитратно-фосфатного буфера рН 5,5).

Активность пероксидазы определяли при 25 °С сразу после выделения ферментов из образцов. Активность фермента рассчитывали по методу Бояркина (Бояркин, 1951) и выражали в условных единицах на мг сырого веса тканей по формуле: $A = \sum (\alpha \beta \gamma) / d t$, где \sum - экстинция (0,125), α – отношение количества буфера, взятого для приготовления вытяжки в мл к весу

сырой ткани, β – степень дополнительного разведения вытяжки в реакционной смеси, γ – степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси, d – толщина поглощающего слоя кюветы, t – время реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Впервые была изучена активность гваякол пероксидаз при разных значениях рН в листовых пластинках тысячелистника азиатского *Achillea asiatica* Serg., вероники дубравной *Veronica chamaedrys* L., одуванчика лекарственного *Taraxacum officinale* Wigg., манжетки городковатой *Alchemilla subcrenata* Buser (рис. 1).

Для вероники дубравной (рис. 1-А) и манжетки городковатой (рис 1-Г) наблюдали уменьшение активности пероксидаз с июля по сентябрь, в то время как для тысячелистника азиатского (рис. 1-Б), наоборот, увеличение. Для одуванчика лекарственного (рис. 1-В) минимум нейтральных пероксидаз приходился на сентябрь, слабокислых на июль, а кислых на август.

Соответственно, в июле в листьях одуванчика преобладали нейтральные гваякол пероксидазы с оптимумом рН 6,6-6,2 и кислые с оптимумом рН 4,8-4,6. В августе у одуванчика лекарственного повышалась активность слабокислых пероксидаз с оптимумом рН 5,8. К сентябрю максимальная активность гваякол пероксидаз у этого растения сохранялась при рН 5,8, но этот пик активности значительно ниже, что характеризует понижение активности фермента и истощение адаптационных ресурсов осенью у этого вида.

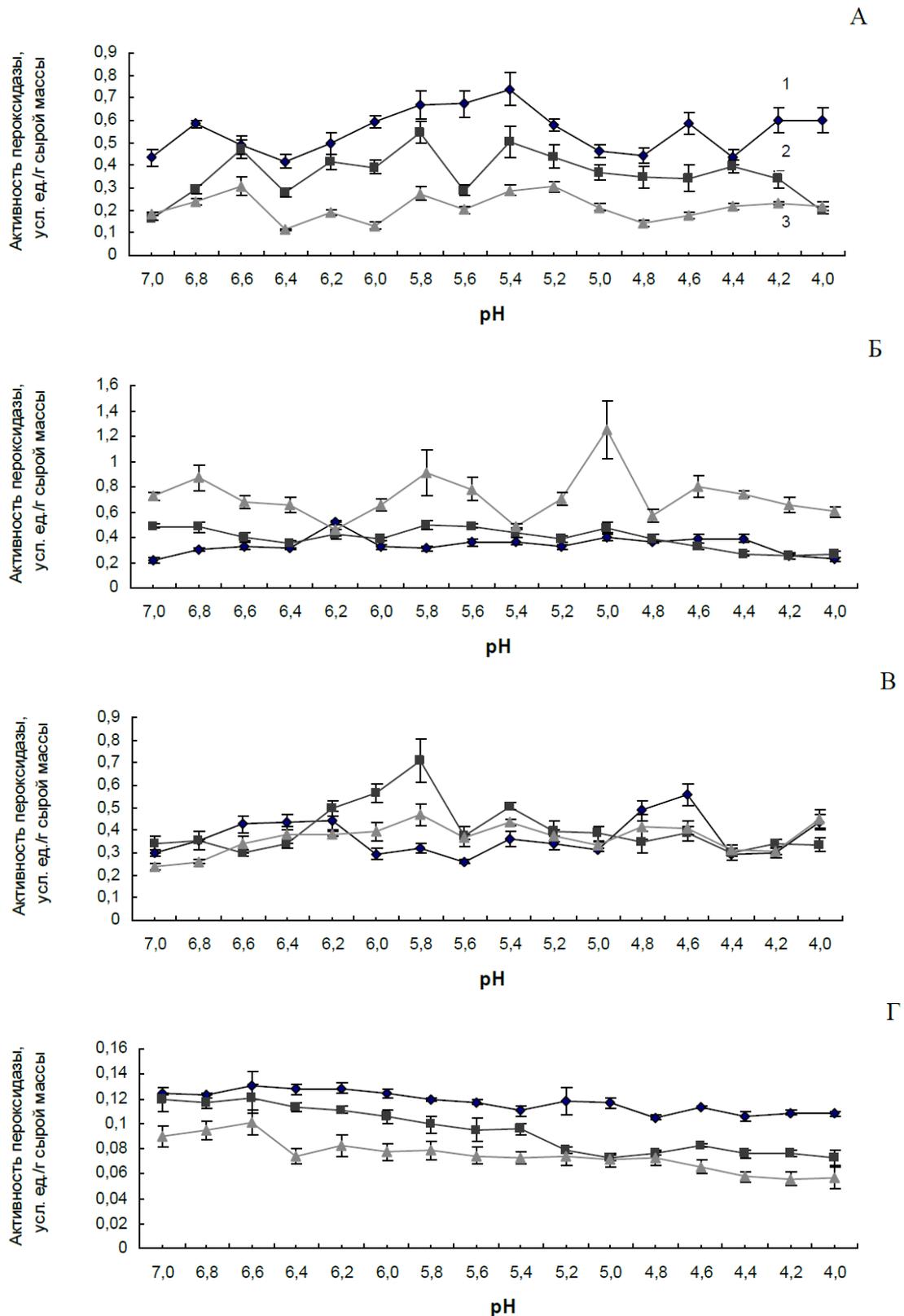


Рисунок 1. Активность общих кислых, слабокислых и нейтральных гваякол пероксидаз в листьях вероники дубравной (А), тысячелистника азиатского (Б), одуванчика лекарственного (В) и манжетки городковатой (Г) на побережье озера Байкал, стационар «речка Выдриная», 2008 г. 1 – июль, 2 – август, 3 – сентябрь

Таким образом, выраженное увеличение активности всех изученных пероксидаз с наступлением неблагоприятных условий произрастания в сентябре наблюдали только у тысячелистника азиатского, что может свидетельствовать о его холодоустойчивости и высоком адаптационном потенциале по отношению к гипотермии. Причем, если в июле у тысячелистника оптимум рН приходился на 6.2, с наступлением августа этот пик перекрывали пероксидазы с активностью при рН 7.0-6.8, 5.8 и 5.0, что может косвенно свидетельствовать о начавшейся экспрессии соответствующих форм фермента. К октябрю все три указанных пика еще сильнее возрастают и дополняются еще одним – 4,6. Минимум активности фермента в сентябре приходится на рН 6.2.

Интересна активность разных групп пероксидаз у манжетки. У нее во все сроки исследований наблюдается общая закономерность: активность кислых пероксидаз была ниже нейтральных и слабокислых гваякол пероксидаз.

Для вероники на фоне общего уменьшения активности пероксидаз с наступлением осени выделяются стабильные пики при рН 6.8-6.6, 5.8, 5.4-5.2, 4.6-4.2, что может свидетельствовать о стабильности изоферментного состава пероксидаз у этого вида в течение всего исследуемого периода вегетации. Для вероники наблюдается совпадающее с литературными данными уменьшение активности фермента в ряду рН от 7 к 4 (Mizobutsi et al., 2010; Kareska, 2009).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В листьях тысячелистника азиатского, вероники дубравной, одуванчика

лекарственного и манжетки городковатой впервые была изучена активность пероксидаз в зависимости от рН.

Для вероники дубравной и манжетки городковатой наблюдали уменьшение активности фермента с июля по сентябрь, а для тысячелистника азиатского, наоборот, увеличение. Для одуванчика лекарственного минимум нейтральных пероксидаз приходился на сентябрь, слабокислых на июль, а кислых на август. Для вероники наблюдали уменьшение активности фермента в ряду рН от 7 к 4.

ЛИТЕРАТУРА

- Андреева В.А., Воронова В.А., Угарова Н.Н. (1979) Активность, изоферментный спектр, термостабильность и молекулярный вес пероксидазы, выделенной из здоровых и зараженных вирусами растений табака. *Биохимия*. **44(3)**, 394–399.
- Бояркин А.Н. (1951) Быстрый метод определения активности пероксидазы. *Биохимия*. **16**. 352.
- Граскова И.А., Боровский Г.Б., Владимирова С.В., Романенко А.С., Войников В.К. (2002) Изоферментные спектры пероксидазы картофеля при патогенезе кольцевой гнили. *Докл. РАН*. **384(6)**, 844–847.
- Карпец Ю.В., Ястреб Т.О., Обозный А.И., Колупаев Ю.Е. (2009) Активность и термостабильность антиоксидантных ферментов корней проростков пшеницы после воздействия экзогенного пероксида водорода. *Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия Биология*. **17(2)**. 62–70.
- Паду Э.Х. (1995) Свойства пероксидазы и фенилаланин-аммиак-лиазы при образовании и лигнификации клеточных

- стенок стебля пшеницы. *Физиология растений*. **42**. 408–415.
- Kareska S. (2009) Factors affecting hydrogen peroxidase activity. *ESSAI*. **7(27)**. 82–85.
- Mizobutsi G.P., Finger F.L., Ribeiro R.A., Puschmann R., de Melo Neves L.L., da Mota W.F. (2010) Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*. **67(2)**. 213–217.
- Müftügil N. (1985) The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat. *J. Sci. Food Agric.* **36**. 877–880.
- Thongsook T., Barrett D.M. (2005) Heat Inactivation and Reactivation of Broccoli Peroxidase. *J. Agric. Food Chem.* **53**. 3215–3222.
- Zolfaghari R., Hosseini S.M., Korori S.A.A. (2010) Relationship between peroxidase and catalase with metabolism and environmental factors in Beech (*Fagus orientalis* Lipsky) in three different elevations. *International J. of Environmental Sciences*. **1(2)**. 243–252.