

ORIGINAL ARTICLE

**Activity of guaiacol-dependent peroxidase in *Plantago major* L.
leaves**

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

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

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

Received April 15, 2013

For the first time, the guaiacol-dependent peroxidase activities have been studied by different pH in lamina of *Plantago major* L.

Key words: peroxidase, activity, officinal plants, Plantago major L., pH.

ORIGINAL ARTICLE

Активность гваякол-зависимой пероксидазы в листьях***Plantago major* L.**

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

Сибирский институт физиологии и биохимии растений, г. Иркутск, Россия

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

Поступила в редакцию 15 Апреля 2013 г.

Впервые была изучена активность гваякол-зависимых пероксидаз при разных значениях pH в листовых пластинках *Plantago major* L.

Key words: peroxidase, activity, officinal plants, Plantago major L., pH.

Оптимум pH катализируемой реакции – важная характеристика ферментов. В частности, пероксидазе, выделенной из томатов, свойственен оптимум pH равный 6,6 (Signoret, Crouzet, 1978), из полыни – 5,2 (Садвакасова, 1981). Пероксидаза хрена имеет несколько оптимумов – при pH 4,5 (Maehly, 1955) и 7,0 (Gaspar et al., 1977), что обусловлено наличием нескольких молекулярных форм фермента, проявляющих максимальную активность в более узких пределах pH (Газарян и др., 1998). Более того, в зависимости от pH среды фермент может катализировать разные реакции. Так, пероксидаза красной водоросли при pH 6,7 катализирует реакцию гидроксилирования фенолов, а при pH 5,4 – реакцию их бромирования в присутствии NaBr (Андреева, 1988). Максимальная активность пероксидазы

перикарпа китайской сливы наблюдается при pH 6,5 и 70°C, а полифенолоксидазы – при pH 6,5 – 6,75 и 20°C (Mizobutsi et al., 2010). Кроме того, у растений с наступлением осени в период с июля по сентябрь может наблюдаться увеличение активности этого фермента (Zolfaghari et al., 2010). Вероятно, это связано с тем, что устойчивость растительных тканей к различным стрессовым воздействиям определяется в немалой степени активностью ферментов, обладающих пероксидазной активностью (Долгова, 2004; Янчевская и др., 2006; Ершова, 2007; Жуйкова и др., 2009; Алиева и др., 2010; Müftlögil, 1985; Thongsook, Barrett, 2005). В то же время, не смотря на интерес к этому ферменту, пероксидаза у многих растительных видов изучена не достаточно.

В этой связи целью наших исследований

было проследить изменения в активности гваякол-зависимой пероксидазы подорожника большого в течение июня, июля и августа при значениях pH 4,6, 5,4 и 6,2 в двух различных точках ареала вида – г. Иркутске и на юго-восточном побережье Байкала в районе устья речки Выдринная.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования. Исследовались листья подорожника большого *Plantago major* L., собранного в течение вегетационного периода 2009 года на территории стационара «Речка Выдринная» и в г. Иркутске.

Выделение слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы. Для выделения пероксидаз слабосвязанных с клеточной стенкой, навеску (1 г) ткани листьев помещали в шприц с 5 мл холодного цитратно-фосфатного буфера (pH 5,5) и выдерживали при разреженном давлении 2–3 раза по 1 мин (Граскова и др., 2004). Полученный раствор центрифугировали 15 мин при 3 тыс. об./мин, отделяя от частиц ткани, и супернатант использовали для дальнейшего определения активности фермента.

Выделение растворимой пероксидазы. Навеску ткани после экстракции слабосвязанных пероксидаз помещали в 5 мл холодного цитратно-фосфатного буфера и растирали в фарфоровой ступке при 4 °С (Паду, 1995) для выделения растворимых пероксидаз. Полученный гомогенат центрифугировали при 3 тыс. об./мин в течение 15 мин. Супернатант использовали для определения активности фермента.

Определение пероксидазной активности. Активность 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 (pH от 4,6 до 6,2 с шагом 0,8), 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 pH 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

В точке отбора проб на берегу озера Байкал активность слабосвязанной пероксидазы у подорожника большого была высокой в июне, заметно снижалась к июлю, но начинала возрастать в августе, причем главным образом за счет активности при pH 5,4 и 6,2 (рис. 1).

Для растворимой фракции гваякол-зависимой пероксидазы картина была обратная (рис. 2). Минимум активности при всех вариантах pH наблюдался в июне, а максимум – в июле.

Сходные данные были получены и по активности пероксидазы в июле и августе для г.

Иркутск (рис. 3, 4). В июле активность слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы не зависела от pH в обеих точках сбора и составляла порядка 0,02 у.е./мг. В отличие от Байкала, в городе Иркутск

повышение активности слабосвязанной с клеточной стенкой гваякол-зависимой пероксидазы в августе происходило за счет повышения ее активности при pH 6,2.

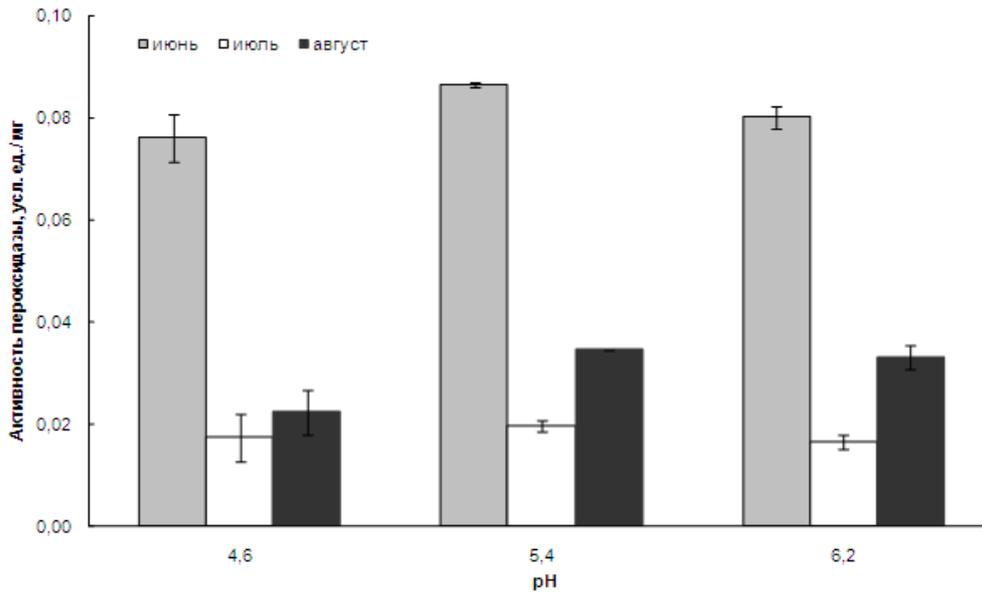


Рисунок 1 Активность слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы листьев *Plantago major* в июне, июле и августе, Байкал

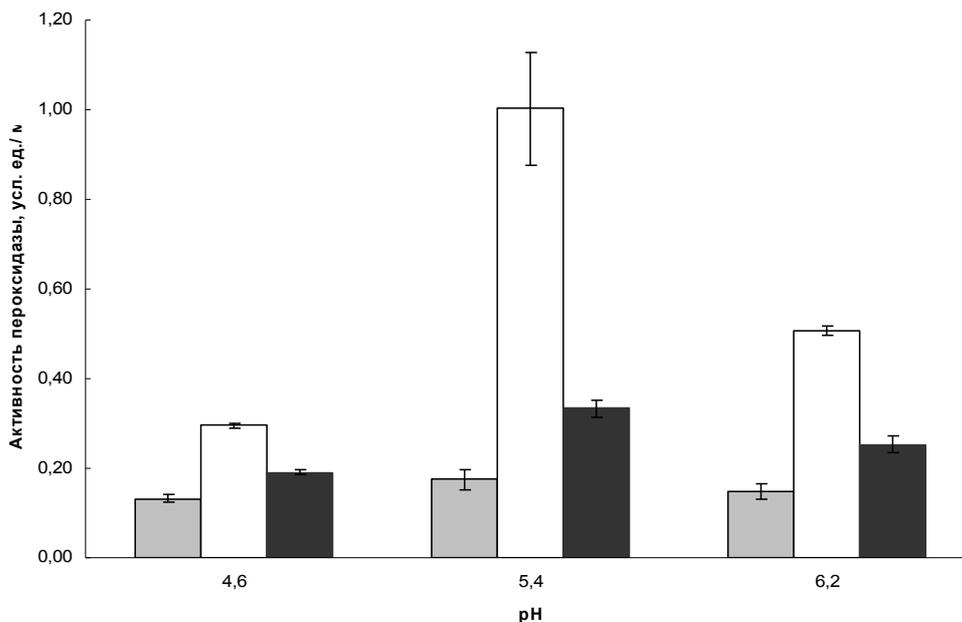


Рисунок 2 Активность растворимой пероксидазы листьев *Plantago major* в июне, июле и августе, Байкал

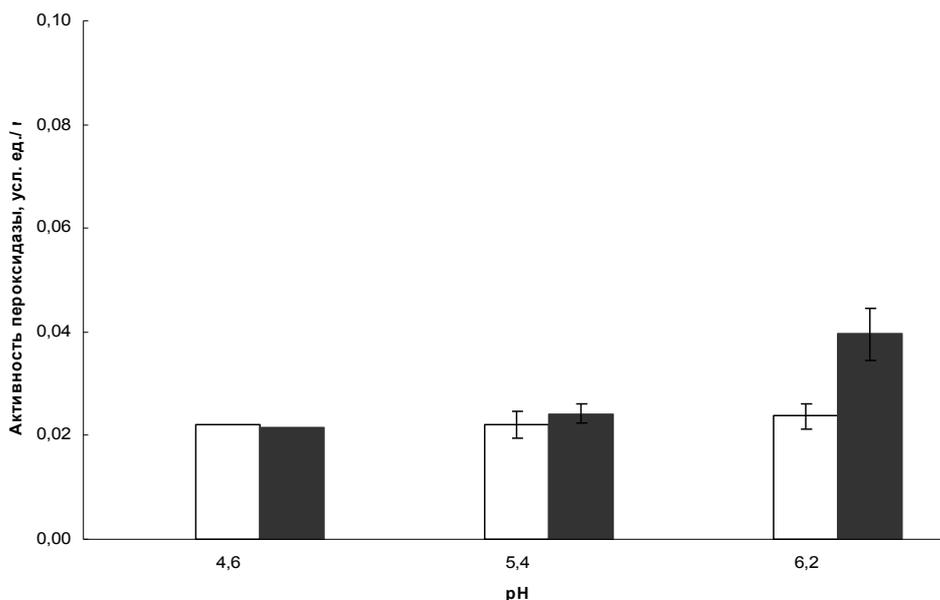


Рисунок 3 Активность слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы листьев *Plantago major* в июле и августе, Иркутск

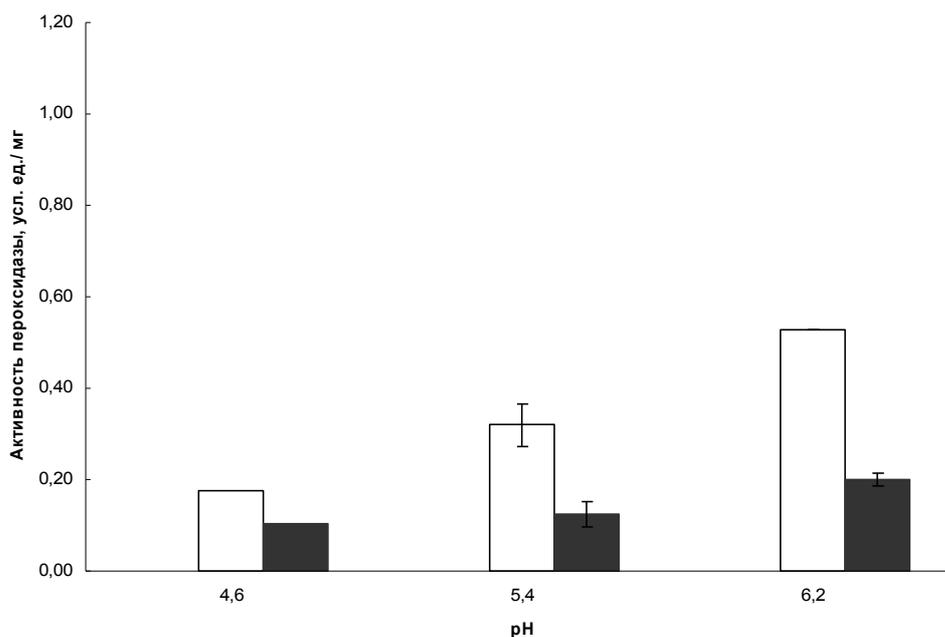


Рисунок 4 Активность растворимой пероксидазы листьев *Plantago major* в июле и августе, Иркутск

Активность растворимой пероксидазы, не смотря на схожесть динамики, была выше на Байкале, чем в Иркутске, за исключением pH 6,2, когда данные по обоим географическим точкам совпали и составили 0,5 у.е./мг для июля и 0,2 для августа. Максимальные значения активности

растворимой пероксидазы для Иркутска наблюдались при этой pH (6,2), а на побережье Байкала активность была максимальна при pH 5,4 и в июле, и в августе.

На основании полученных данных можно предполагать следующее: не смотря на то, что

растворимая пероксидаза обычно доминирует в растительных тканях, адаптация к осенним сезонным изменениям у одуванчика связана главным образом с увеличением активности слабосвязанной пероксидазы как более подвижной фракции этого фермента. В то же время, влияние города Иркутск выразалось в уменьшении активности не слабосвязанной, а растворимой гваякол-зависимой пероксидазы подорожника при всех значениях pH как в июле, так и в августе по сравнению с побережьем Байкала.

REFERENCES

- Алиева Д.Р., Бабаев Г.Г., Азизов И.В. (2010) Активность и изоферментный состав пероксидазы клеток *Dunaliella salina* при солевом стрессе. *Вестник Днепропетровского университета. Биология. Медицина.* **1(1)**, 16-21.
- Андреева В.А. (1988) Фермент пероксидаза. М.: Наука, 128 с.
- Бояркин А.Н. (1951) Быстрый метод определения активности пероксидазы *Биохимия.* **16**. 352.
- Газарян И.Г., Упоров И.В., Чубарь Т.А., Федчина В.А., Мареева Е.А., Лагримини Л.М. (1988) Влияние pH на стабильность анионной пероксидазы табака и ее взаимодействие с перекисью водорода *Биохимия.* **63(5)**. 708-716.
- Граскова И.А., Боровский Г.Б., Колесниченко А.В., Войников В.Л. (2004) Пероксидаза как компонент сигнальной системы клеток картофеля при патогенезе кольцевой гнили *Физиология растений* **51(5)**. 692-697.
- Долгова Л.Г. (2004) Активность пероксидазы – показатель устойчивости растений-интродуцентов в условиях степной зоны Украины. *Вестник Днепропетр. Ун-та.* **1**. 38-41.
- Ершова А.Н. (2007) Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. – Воронеж.: Изд-во Воронеж. гос. ун-та., – 264с.
- Жуйкова Т.В., Безель В.С. (2009) Адаптация растительных систем к химическому стрессу: популяционный аспект. *Вестник Удмуртского университета*, **1**. 31-42.
- Паду Э.Х. (1995) Свойства пероксидазы и фенилаланин-аммиак-лиазы при образовании и лигнификации клеточных стенок стебля пшеницы. *Физиология растений.* **42**. 408–415.
- Садвакасова Г.Г. (1981) Пероксидаза полыни и окислительный распад флавоноидов (на примере кверцетина): Автореф. дис. ...канд. биол. наук. Алма-Ата., 25 с.
- Янчевская Т.Г., Гриц А.Н, Ковалёва О.А. (2006) Влияние ультрафиолетового облучения суммарного диапазона на активность пероксидазы листьев меристемных регенерантов картофеля (*Solanum tuberosum*). *Вестн БГПУ., № 2. Серия 3.* 38-40.
- Gaspar N., Wyndacker R., Bouchet M., Ceulemans E. (1977) Peroxidase and amylase activities in relation to germination of dormant and nondormant wheat. *Physiol. Plant.* **40(1)**. 11-14.
- Kareska S. (2009) Factors affecting hydrogen peroxidase activity. *ESSAI.* **7(27)**. 82–85.
- Maehly A.C. (1955) Plant peroxidase. *Methods in Enzymology.* **2**. 801-813.
- 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.
- Signoret A., Crouzed J. (1978) Activities polyphenoloxidase et peroxidase du fruit de la tomate (*Lycopersicon esculentum*), purification et quelques propriétés. *Arg. Biol. Chem.* **42(10)**. 1527-1530.
- 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.