

Е.Н. Виноградова

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ПЕРОКСИДАЗЫ ЛИСТЬЕВ *POPULUS DELTOIDES* MARSH. И *FRAXINUS LANCEOLATA* BORKH. В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

ясень зелёный, тополь канадский, техногенное загрязнение, пероксидаза, компонентный состав, кинетические свойства

Ферментативная активность является комплексным показателем метаболизма растений, изменения в котором могут быть обусловлены как сдвигом в количестве молекул фермента, так и модификацией их физико-химических свойств. При этом качественные изменения лабильных ферментов более значимы в реализации стратегии адаптации растительного организма, чем количественные [8]. Качественные изменения ферментов связаны как с варьированием их компонентного состава, так и с изменением каталитических характеристик. В свою очередь, изменение интенсивности «работы» молекулы фермента может быть связано как с влиянием регуляторов ферментативной активности (субстраты и продукты реакции, активаторы и ингибиторы), так и с изменением свойств ферментативной молекулы [1]. В ответ на изменение внешней среды возможно включение одновременно всех типов регуляции ферментативной активности в организме [11].

Концентрация субстрата и рН среды относятся к основным факторам, влияющим на скорость ферментативной реакции. Отличия в рН-оптимуме в определённых случаях могут обуславливать выполнение ферментом различных физиологических функций [9]. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата выражается величиной K_m (константой Михаэлиса), равной концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной. Как известно, чем меньше значения K_m , тем выше сродство фермента к субстрату, поскольку в таком случае достижение половины максимальной скорости реакции происходит при меньших концентрациях данного субстрата [7]. Наряду с рН-оптимумом, константа Михаэлиса является одним из основных параметров кинетической характеристики фермента. Значение этого показателя в регуляции ферментативной активности определяется тем, что, как правило, концентрации субстратов в тканях значительно ниже тех, которые необходимы для насыщения ферментов. Поэтому небольшие изменения K_m могут сопровождаться существенными изменениями в скорости ферментативной реакции [11].

Цель работы – сравнительное изучение компонентного состава и кинетических свойств пероксидазы, выделенной из листьев древесных растений, в связи с их устойчивостью к техногенному загрязнению среды.

В исследованиях использовали ясень зелёный (*Fraxinus lanceolata* Borkh.), обладающий сильной повреждаемостью листьев техногенными выбросами, который произрастает на промплощадке коксохимического завода, и проявляющий полигенную устойчивость к различным типам загрязнения тополь канадский (*Populus deltoides* Marsh.) с территории коксохимического и фенольного заводов [5]. В качестве контрольных

были выбраны растения этих видов из насаждений с фоновым уровнем загрязнения (парковые зоны г. Донецка). Образцы листьев для лабораторных анализов отбирали с нескольких деревьев (10 – 13) репродуктивного возраста во второй половине вегетации. Для выделения пероксидазы (К.Ф.1.11.1.7) из фиксированных жидким азотом листьев проводили экстракцию трис-НСl буфером рН 7,4, осаждение белков сульфатом аммония в пределах насыщения от 30 до 90% и последовательные гель-фильтрации на сефадексах G-25 и G-100 (Pharmacia, Sweden). Фракции, обладавшие пероксидазной активностью, объединяли и использовали для изучения свойств ферментов. Для определения K_m исследовали зависимость начальной скорости пероксидазной реакции (V_0) от концентрации субстрата (S). Начальную скорость ферментативной реакции определяли по изменению оптической плотности при 410 нм в области линейной зависимости изменения оптической плотности во времени. В качестве субстратов использовали пероксид водорода и хлорогеновую кислоту. Пероксидазную активность определяли спектрофотометрически на “Specol–11”, используя в качестве субстрата гваякол, и выражали в изменении оптической плотности за 1 сек. на 1 мг белка [3]. Количество белка устанавливали по М. Бредфорду [12]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Г. Ф. Лакину [6] с помощью пакета Mikrosoft Excel.

В суммарных препаратах пероксидазы, полученных после хроматографии на сефадексе G-100, удельная активность фермента, по сравнению с экстрактами, увеличена в 3 – 4 раза. Таким образом, в процессе выделения пероксидазы, наряду с удалением низкомолекулярных веществ, удалось в значительной степени очистить фермент от сопутствующих белков.

Изучение компонентного состава пероксидазы показало, что электрофоретический спектр фермента, выделенного из листьев растений *F. lanceolata*, испытывавших влияние эмиссий коксохимического завода, идентичен контрольному варианту опыта и включает три зоны активности (рис. 1.). Изоферментный спектр пероксидаз, выделенных из листьев растений *P. deltoides* контрольного насаждения, был значительно сложнее

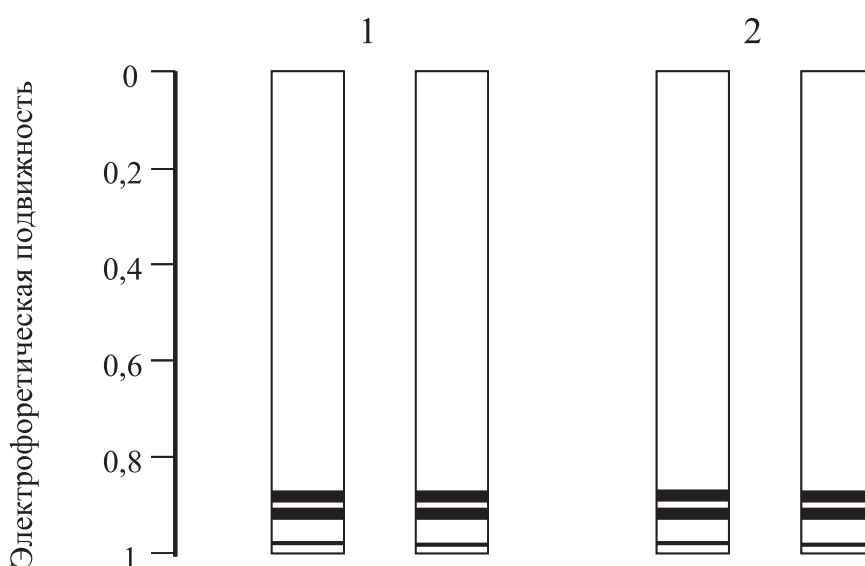


Рис 1. Электрофоретический вариант пероксидазы исходного экстракта (а) и очищенного препарата фермента (б), выделенного из листьев растений *Fraxinus lanceolata* Borkh, произрастающих в условиях фонового уровня загрязнения (1) и промплощадки коксохимического завода (2).

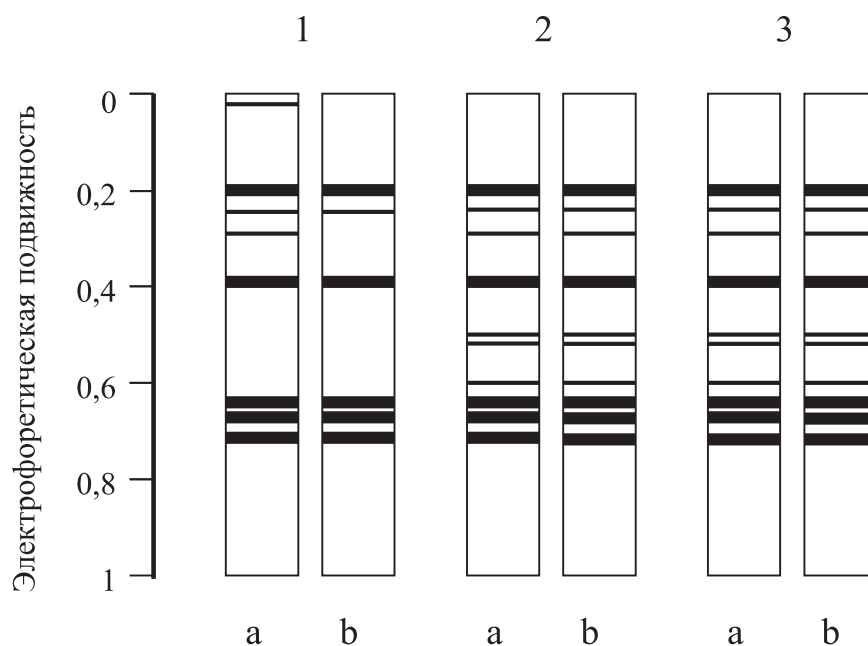


Рис 2. Электрофоретический вариант пероксидазы исходного экстракта (а) и очищенного препарата фермента (b), выделенного из листьев растений *Populus deltoides* Marsh., произрастающих в условиях фонового уровня загрязнения (1), а также промплощадок фенольного(2) и коксохимического (3) заводов.

и включал 8 электрофоретических зон (рис. 2.). В очищенном ферментном препарате контрольного варианта исчезла одна малоподвижная минорная зона, потерянная, по-видимому, в процессе очистки фермента. Данная электрофоретическая зона в остальных вариантах опыта отсутствует.

Изоферментный спектр пероксидазы как экстракта, так и очищенного препарата фермента из листьев растений *P. deltoides* техногенных экотопов включал три дополнительных минорных компонента. Возможно, дополнительные изоферменты пероксидазы, выявленные в листьях растений *P. deltoides*, произрастающих в условиях техногенной нагрузки, и не свойственные растениям контрольных насаждений, играют определённую роль в адаптации *P. deltoides* к техногенному загрязнению и являются составной частью «стрессового набора изопероксидаз», формирующегося в растениях под влиянием стрессовых факторов [8], в том числе и при загрязнении воздуха токсичными газами [13].

Анализ полученных нами результатов свидетельствует, что рН-оптимум пероксидазы, выделенной из листьев *F. lanceolata* исследованных экотопов, одинаков как в 0,2 М ацетатном буфере – 5,7, так и в 1/15 М фосфатном буфере – 6,5. Значение рН-оптимума пероксидазы из листьев *P. deltoides* исследованных экотопов с 0,2 М ацетатным буфером находится в пределах 5,3 – 5,5, а с 1/15 М фосфатным буфером равно 6,2. То есть, с использованием одних и тех же буферов, рН-оптимум пероксидазы, выделенной из листьев тополя канадского, несколько сдвинут в сторону большей кислотности, по сравнению с рН-оптимумом пероксидазы ясеня зелёного. Поскольку действие стрессовых факторов, ингибирующих протонную помпу, обычно приводит к закислению цитоплазмы [10], некоторый сдвиг оптимальных условий проявления активности фермента в сторону большей кислотности может быть одним из факторов более высокой устойчивости листьев *P. deltoides* к промышленным выбросам, по сравнению с *F. lanceolata*.

Для определения сродства к субстратам использовали пероксидазу, выделенную из листьев растений *F. lanceolata*, произрастающих на промплощадке коксохимического завода и *P. deltoides* – фенольного завода, а также из листьев контрольных растений. Величины константы Михаэлиса были рассчитаны на основании линейного преобразования уравнения Михаэлиса-Ментен методом двойных обратных величин Лайнуивера-Берка.

Анализируя полученные результаты, приведённые в таблице, следует отметить, что сродство к пероксиду водорода пероксидазы, выделенной из листьев *P. deltoides*, значительно выше, чем фермента из листьев *F. lanceolata*, что может свидетельствовать о разной интенсивности детоксикации данной активной формы кислорода в листьях растений исследуемых видов.

Отчётливо прослеживается тенденция, что K_m пероксидазы листьев растений *F. lanceolata*, подверженных в ходе онтогенеза влиянию выбросов коксохимического завода, ниже, соответственно, сродство по отношению к исследованным субстратам выше, по сравнению с ферментом листьев контрольных растений, что достоверно подтверждено для K_m по хлорогеновой кислоте. Для пероксидазы листьев растений *P. deltoides* выявлена обратная зависимость – более низкие концентрации субстратов для достижения скорости реакции, равной половине максимальной, необходимы ферменту, выделенному из листьев контрольных растений, что достоверно подтверждено для K_m по пероксиду водорода.

Ранее нами было показано, что пероксидаза листьев растений *P. deltoides*, произрастающих в зоне действия коксохимического и фенольного заводов, отличалась большей устойчивостью *in vitro* к ингибирующему действию отдельных ингредиентов промышленных выбросов (фенол и пиридин) [2]. Для пероксидазы из листьев растений *F. lanceolata* техногенных территорий повышенная устойчивость к прямому влиянию данных токсикантов не выявлена.

Таблица. Константа Михаэлиса (K_m , ммоль) пероксидазы, выделенной из листьев растений *Fraxinus lanceolata* Borkh. и *Populus deltoids* Marsh., произрастающих в условиях промплощадок и фонового уровня загрязнения

Растение	Вариант опыта	Субстрат	
		пероксид водорода	хлорогеновая кислота
Ясень зелёный	фоновое загрязнение	43,47 ± 7,37	1,39 ± 0,16*
	коксохимический завод	35,29 ± 7,31	0,90 ± 0,09
Тополь канадский	фоновое загрязнение	1,06 ± 0,15	2,40 ± 0,98
	фенольный завод	2,76 ± 0,31*	2,73 ± 0,26

Примечание: * – различие между K_m пероксидазы, выделенной из листьев растений контрольных и техногенных участков достоверно при $p \leq 0,5$.

Изменение величины K_m возможно вследствие структурных изменений активного центра или всей молекулы фермента [7]. В литературе есть сведения о возможности конформационных перестроек молекул пероксидазы при действии на растения стрессовых факторов [8], в том числе и антропогенного загрязнения среды [5]. Характер конформационных изменений пероксидазы листьев растений, испытывавших в процессе онтогенеза влияние промышленных выбросов, может определяться как спецификой действия разнокачественных эмиссий на растения, так и возможностями адаптации фермента к этим воздействиям [5]. По всей видимости, модификации пероксидазы листьев *P. deltooides* техногенных территорий способствуют защите активного центра фермента, снижая его чувствительность к прямому влиянию токсикантов и вызывая уменьшение сродства фермента к исследуемым субстратам.

Таким образом, в очищенном препарате пероксидазы из листьев растений *P. deltooides* техногенных территорий выявлено 3 дополнительных изофермента, несвойственных контрольным растениям, а также увеличение K_m фермента по отношению к пероксиду водорода, что, вероятно, является следствием модификаций молекул фермента при адаптации растений к условиям техногенной нагрузки и способствует снижению его чувствительности к прямому влиянию токсикантов. У пероксидазы из листьев *F. lanceolata* промплощадки коксохимического завода отсутствуют изменения электрофоретического спектра и увеличение K_m по отношению к исследуемым субстратам, напротив, выявлено снижение K_m по хлорогеновой кислоте, что, возможно, в какой-то мере объясняет высокую чувствительность фермента к непосредственному влиянию компонентов эмиссий.

1. Алёхина Н. Д., Ключикова А. И. Температура среды и адаптивные изменения свойств ферментов ассимиляция азота у растений // Вестн. МГУ. Сер. 16. – 1988. – № 3. – С. 3 – 15.
2. Виноградова Е. Н., Коршиков И. И. Влияние *in vitro* фенола и пиридина на активность пероксидазы листьев древесных растений, произрастающих в условиях фенольного и коксохимического заводов // Наук. вісн. Чернівецьк. ун-ту. Сер. Біологія. – 2005. – Вип. 260. – С. 37 – 46.
3. Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина А. М. Большой практикум по физиологии растений. – М.: Высш. шк., 1975. – 391 с.
4. Дмитриев Л. Ф. Ферментативный катализ: роль среды в энергетическом сопряжении // Успехи соврем. биол. – 2001. – 121, № 5. – С. 419-427.
5. Коршиков И. И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязнённой среды. – Киев: Наук. думка, 1996. – 239 с.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1973. – 343 с.
7. Лютова М. И. Изменение термостабильности и кинетических свойств ферментов при адаптации растений к температуре // Физиология растений – 1995. – 42, № 6. – С. 929 – 941.
8. Савич И. М. Пероксидазы – стрессовые белки растений // Успехи соврем. биол. – 1989. – 107, вып. 3. – С. 406 – 417.
9. Садаквасова Г. Г., Кунаева Р. М. Некоторые физико-химические и физиологические свойства пероксидазы растений // Физиология и биохимия культ. растений. – 1987. – 19, № 2. – С. 107 – 119.
10. Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та. – 2002. – 244 с.
11. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. – М: Мир. – 1988. – 586 с.
12. Bredford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – 72. – P. 248 – 254.
13. Hazell P., Murray D. Peroxidase isoenzyme and leaf senescence in sunflower, *Helianthus annuus* L. // Z. Pflanzenphys. – 1982. – 108, № 1. – P. 87 – 92.

УДК 581.19:934.942:632.15

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ПЕРОКСИДАЗЫ ЛИСТЬЕВ
POPULUS DELTOIDES MARSH. И *FRAXINUS LANCEOLATA* BORKH. В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО
ЗАГРЯЗНЕНИЯ.

Е.Н. Виноградова

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Исследовали свойства очищенной с помощью гель-фильтрации пероксидазы, выделенной из листьев растений *Populus deltoides* Marsh. и *Fraxinus lanceolata* Borkh., произрастающих на промплощадках крупных промышленных производств Донбасса. Электрофоретический спектр пероксидазы из листьев неустойчивого к промышленным выбросам *F. lanceolata* техногенных и контрольных участков идентичен, выявлено изменение константы Михаэлиса по отношению к хлорогеновой кислоте. Установлены дополнительные зоны активности в электрофоретическом спектре пероксидазы из листьев более устойчивого к аэроплютантам *P. deltoides* на промплощадке, что, наряду с изменением константы Михаэлиса по отношению к пероксиду водорода, может свидетельствовать об адаптивных модификациях молекул фермента в условиях техногенной нагрузки

UDC 581.19:934.942:632.15

KINETIK PROPERTIES AND COMPONENT COMPOSITION OF PEROXIDASE FROM LEAVES OF
POPULUS DELTOIDES MARSH. AND *FRAXIMUS LANCEOLATA* BORKH., GROWING UNDER
TECHNOGENIC CONDITIONS.

Ye.N. Vinogradova

Donetsk Botanical Gardens, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine

Peroxidase from *Populus deltoides* Marsh. and *Fraximus lanceolata* Borkh., growing on industrial sites of the Donbass large industrial enterprises was researched. The enzyme was isolated from the leaves of the studied plants and then purified with gel filtration chromatography. Electroforetic spectrum of peroxidase from the leaves of non-resistant to industrial emissions *F. lanceolata* of technogenic and control plots is the same. Alteration of Michaelis constant against chlorogenic acid is revealed. Additional activity zones in electroforetic spectrum of peroxidase isolated from the leaves of more resistant to airpollutants *P. deltoides* from industrial site are established, that side by side with the alteration of Michaelis constant against hydrogen peroxid can testify to the adaptive modifications of the enzyme molecules under technogenic load.