

Определение удельной активности пероксидазы ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*) и проса обыкновенного (*Panicum miliaceum*) при воздействии озона и постоянного магнитного поля

© Пурыгин* Петр Петрович, Цаплев Денис Алексеевич,

Цаплева Екатерина Викторовна и Зарубин⁺ Юрий Павлович

Кафедра органической, биоорганической и медицинской химии. Самарский государственный университет. Ул. Академика Павлова, 1. г. Самара, 443011. Самарская область. Россия.

Тел.: (846) 334-54-59. Факс: (846) 334-54-17. E-mail: puruginpp2002@mail.ru

*Ведущий направление; ⁺Поддерживающий переписку

Ключевые слова: пероксидаза, ячмень, просо, озонатор, магнитное поле.

Аннотация

Предложен эффективный и экологически безопасный метод обработки сельскохозяйственных растений озоном и постоянным магнитным полем. При исследовании уровня пероксидазы опытных растений ячменя обыкновенного и проса обыкновенного при воздействии постоянного магнитного поля и озона, была установлена более высокая концентрация исследуемого фермента в сравнении с контролем. Данный способ обработки растений может быть применён в различных отраслях сельского хозяйства.

Введение

Пероксидаза является одним из наиболее активно изучаемых ферментов в растительных и животных тканях. Данный фермент позволяет поддерживать молекулы в стабильном состоянии, что является необходимым для таких биологических систем как клетки. Реакции, участие в которых принимает пероксидаза, характеризуются переносом протона от молекулы субстрата к пероксидам, в результате чего происходит образование свободных радикалов, которые являются высокореакционными соединениями, способными оказывать бактерицидное действие [1, 2].

Пероксидаза является специфической молекулой, сочетающей активный центр (небелковый компонент), с помощью которого происходит химическое взаимодействие с молекулами-субстратами, и белковый компонент, усиливающий это взаимодействие. Белковый компонент имеет диаметр 5 нм и содержит 43% α -спиральных участков. Активный центр представляет собой железопропорфирин. Считается, что все известные пероксидазы и их изоформы включают этот гем, поскольку они ингибируются азидами и цианидами [1-3].

Важными особенностями пероксидазы являются её оксигеназная активность, каталитические свойства, регуляция окислительного стресса биологических систем. Новейшие достижения гетерологической экспрессии пероксидазы в клетках *E.coli* и реактивации рекомбинантных пероксидаз дают возможность получения рекомбинантных конъюгатов с пероксидазой в качестве фермента-маркера и применения их в иммуноферментном анализе [1, 3].

В связи с постоянным ростом интереса к пероксидазам, исследованию их активности в различных условиях и механизмам их биосинтеза и воздействия на молекулы субстратов, актуальной задачей на сегодняшний день является анализ активности пероксидазы при различных видах воздействия на биологические объекты, что, в свою очередь, позволит оценить способности фотосинтеза, энергетического обмена, окислительно-восстановительного баланса изучаемой системы.

Экспериментальная часть

Целью настоящего исследования является определение удельной активности пероксидазы ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*) и проса обыкновенного (*Panicum miliaceum*) при воздействии озона и магнитного поля [4]. Данное воздействие было направлено непосредственно на семена ячменя, а результаты воздействия исследовались на седьмой день у проростков семян.

Одной из задач исследования являлось определение наиболее эффективного сочетания времени (с) и уровня индукции магнитного поля (Гс) под действием озонатора или без него [5-8].

Объектами исследования являлись проростки семян ячменя. Исследования проводились в условиях оранжереи Ботанического сада при Самарском государственном университете. Семена ячменя выращивали в течение 7 дней.

Результаты исследований фиксировались на 7 день. Для эксперимента использовалось по 4000 семян ячменя и проса, по 3000 из которых подвергались воздействию озонатора и постоянного магнитного поля. Данные семена ячменя и проса делили на 3 равные части (по 1000 семян), каждая из которых подвергалась различному воздействию магнитного поля с индукциями 100, 200, 300 Гс. Воздействие магнитного поля на семена проводили с продолжительностью времени от 1 до 5 мин. В качестве контроля использовали по 1000 семян ячменя и проса выращенных без соответствующих воздействий.

Назначение озонатора в данном исследовании – создание условий с повышенным содержанием озона для семян ячменя и проса.

Для получения препаратов пероксидазы брали навеску надземной части растений массой 0.18 г, растирали с добавлением 5.5 мл воды в фарфоровой ступке и переносили в колбу. После 15 мин настаивания вытяжку центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант (около 5.7 мл) использовали для исследований. Активность пероксидазы в полученной вытяжке определяли колориметрическим методом по Бояркину [4, 5]. Данный метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина путём фотометрирования образующегося продукта реакции.

В две кюветы приливали 2 см³ центрифугата, 2 см³ буферного раствора и 2 см³ раствора бензидина. Измерение проводили с использованием зелёного светофильтра при 590 нм (ФЭК КФК-3, Россия). В контрольную кювету приливали 2 см³ воды, а в опытную – 2 см³ 0.01% перекиси водорода. С внесением первой капли перекиси водорода включали секундомер и останавливали его, как только значение оптической плотности достигало значения 0.250 [4, 5].

Для определения активности пероксидазы использовали формулу вычисления произведения константы оптической плотности (0.2), отношения количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки к массе сырой ткани (277.8 см³/г), степени постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси в кювете (4) по отношению к толщине слоя кюветы (2 см) и времени (сек), которое исследовали до достижения значения оптической плотности 0.250. Формула расчёта:

$$A = \frac{D \cdot a \cdot b}{c \cdot t}$$

где A – удельная активность препарата пероксидазы усл.ед./г сырой массы; D – оптическая плотность, 0.2; a – отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, к массе сырой ткани, 277.8 см³/г; b – степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси в кювете, 4; c – толщина слоя, 2 см; t – время, с.

Вычисление времени с внесением первой капли перекиси водорода фиксировали в секундах (табл. 1, 2), после чего полученные данные использовали для формулы вычисления удельной активности пероксидазы (рис. 1, 2).

Табл. 1. Результаты времени (с) взаимодействия перекиси водорода с пероксидазой ячменя.
Значение контроля – 34.17 с.

Время (мин)	Индукция магнитного поля		
	100 Гс	200 Гс	300 Гс
1	25.35	26.59	21.26
2	23.53	22.90	24.95
3	18.40	22.57	27.09
4	20.86	22.07	28.29
5	25.99	27.10	29.60

Табл. 2. Результаты времени (с) взаимодействия перекиси водорода с пероксидазой проса.
Значение контроля – 53.91 с.

Время (мин)	Индукция магнитного поля		
	100 Гс	200 Гс	300 Гс
1	20.90	25.15	26.48
2	19.95	32.11	29.23
3	24.40	33.39	30.23
4	43.64	40.86	42.24
5	44.11	42.13	40.17

Зафиксированное время определяло скорость взаимодействия перекиси водорода с пероксидазой исследуемых растений.

Таким образом, наименьшее время при внесении первой капли перекиси водорода до достижения значения оптической плотности 0.250 показывало наибольшее содержание пероксидазы в опытной навеске растения. Соответственно, наибольшее время в данном исследовании означало наименьшее содержание пероксидазы [4].

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования активности пероксидазы ячменя на 7 сутки при воздействии озонатора и магнитного поля приведены на рис. 1.

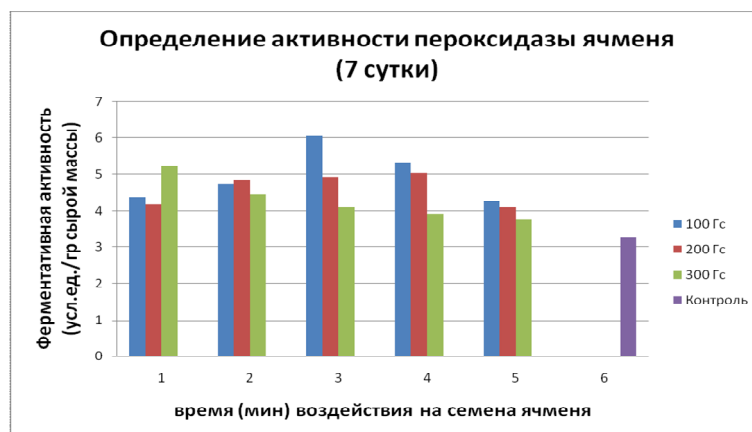


Рис. 1. Определение активности пероксидазы ячменя (7 сутки). На оси ординат отложены уровни активности пероксидазы в вытяжке из надземной части ячменя (усл.ед./г сырой массы). По оси абсцисс даны значения времени воздействия озонатора и магнитного поля на семена ячменя от 1 до 5 мин, где 1 – 1 мин, 2 – 2 мин, 3 – 3 мин, 4 – 4 мин, 5 – 5 мин. Для столбца 6 указано значение активности пероксидазы в контроле.

Результаты исследования активности пероксидазы ячменя при воздействии озонатора и магнитного поля приведены на рис. 2.

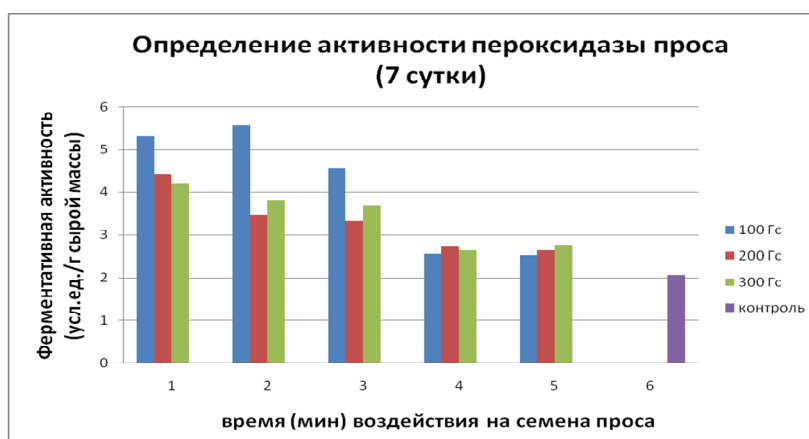


Рис. 2. Определение активности пероксидазы проса (7 сутки). На оси ординат отложены уровни активности пероксидазы в вытяжке из надземной части ячменя (усл.ед./г сырой массы).

По оси абсцисс даны значения времени воздействия озонатора и магнитного поля на семена ячменя от 1 до 5 мин, где 1 – 1 мин, 2 – 2 мин, 3 – 3 мин, 4 – 4 мин, 5 – 5 мин.

Для столбца 6 указано значение активности пероксидазы в контроле.

Результаты определения активности пероксидазы ячменя и проса позволяют предположить о наличии дозозависимого увеличения уровня исследуемого фермента при воздействии озонирования и постоянного магнитного поля.

В отличие от динамики удельной активности пероксидазы ячменя обыкновенного, наибольшая активность пероксидазы проса наблюдается на 1-й, 2-й, 3-й минутах воздействия озона и электромагнитного поля, тогда как в случае с ячменем максимум активности прослеживается при 300 Гс на 1-й минуте, а при 100 и 200 Гс на 3-й и 4-й минутах.

Заключение

Исследование динамики активности пероксидазы проса и ячменя при воздействии озонатора и магнитного поля в сравнении с контрольной группой растений позволяет сделать вывод, что данные воздействия на семена опытных растений увеличивают уровень исследуемого фермента в зависимости от напряжённости и времени воздействия магнитного поля.

На основе полученных результатов, можно заключить, что увеличение уровня пероксидазы ячменя и проса способно повлиять на некоторые процессы фотосинтеза растений и, возможно, привести к трансформации некоторых ксенобиотиков. В случае получения положительного результата исследований данного эффекта, предполагается применить метод совместного действия озонатора и магнитного поля в условиях сельского хозяйства, для профилактики стрессовых состояний, ранениях, вирусном или микробном инфицировании растительных организмов [1, 2, 3, 5].

Выводы

1. Наиболее высокая удельная активность пероксидазы ячменя (*Hordeum vulgare*) обыкновенного наблюдается при воздействии индукции магнитного поля 100 Гс в течение 3 мин непосредственно на семена.
2. Наиболее высокая удельная активность пероксидазы проса (*Panicum miliaceum*) обыкновенного наблюдается при воздействии индукции магнитного поля 100 Гс в течение 2 мин непосредственно на семена.

Литература

- [1] Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. М.: Наука. 1988. 128с.
- [2] Sakharov I.Yu., Castillo J.A., Areza J.C. Purification and stability of peroxidase of African oil palm *Elaies guineensis*. *Bioseparation*. 2000. Vol.5. P.9. 125-132.
- [3] Угарова Н.Н., Лебедева О.В. Неорганическая биохимия. Т. 2. пер. с англ. М.: Мир. 1978. С.34-68.
- [4] Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат. 1987. С.41-43.
- [5] Абрамова Л.И. Ростовые и физиологические особенности формирования урожая озимой пшеницы при предпосевной обработке семян физическими факторами. Тез. докл. на II Всесоюзн. конференции по радиологии. Обнинск. 1984. Т.1. С.164-165.
- [6] Путько В.Ф., Головина К.В., Пурыгин В.А., Васильева Т.И., Советкин Д.А., Пурыгин П.П. Исследование воздействия СВЧ электромагнитного поля на микрофлору и насекомых какао-порошка. *Бутлеровские сообщения*. 2012. Т.31. №8. С.79-82.
- [7] Путько В.Ф., Головина К.В., Пурыгин В.А., Васильева Т.И., Советкин Д.А., Пурыгин П.П. Физические способы дебактеризации какао-бобов и какао-порошка. *Бутлеровские сообщения*. 2012. Т.31. №8. С.83-85.
- [8] Абакачева Е., Сулейманов Д., Шулаев Н.С. Исследование физико-механических свойств полимерных материалов, модифицированных в электромагнитном поле СВЧ-диапазона. *Бутлеровские сообщения*. 2011. Т.24. №1. С.95-98.