

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**РАСТИТЕЛЬНЫЕ ЛАККАЗЫ**

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

Студентки 4 курса 421 группы  
Направления 06.03.01 Биология  
Биологического факультета  
Тертышник Екатерины Александровны

Научный руководитель:  
доцент, к.б.н

Га -  
(подпись, дата)  
10.05.21.

А. А. Галицкая

Научный консультант:  
с.н.с. лаборатории экологической  
биотехнологии ИБФРМ РАНк.б.н.

Д -  
(подпись, дата)  
10.05.21

Е.В. Дубровская

Зав. кафедрой биохимии и биофизики.  
д.б.н., профессор

Коннова  
(подпись, дата)  
10.05.2021.

С. А. Коннова

Саратов 2021

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Лакказа (КФ 1.10.3.2, бензолдиол: кислород оксидоредуктаза) – это фермент, катализирующий окисление широкого спектра фенольных субстратов и некоторых неорганических ионов с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды. Данный фермент широко распространен в природе. Он был обнаружен в грибах, растениях, бактериях, насекомых и археях. Лакказы участвуют в защите растений от биотических и абиотических стрессов путем лигнификации клеточных стенок, создавая механическую преграду, участвуют в регенерации тканей, поддержании структуры и целостности клеточной стенки, образуют из эндогенных фенольных соединений хиноны, токсичные для фитопатогенов. Очистка лакказ очень сложна из-за локализации фермента на клеточной стенке и низкой экспрессии. Несмотря на то, что растительные лакказы известны с 19 века, до сих пор очень мало работ по их выделению и характеристике, что обусловлено сложностью этих процедур. Вероятно, поэтому до сих пор охарактеризованы лишь немногие растительные лакказы.

**Цель и задачи исследования.** целью данной работы являлось выявление растений с высокой лакказоподобной активностью и отработка методики выделения и очистки ферментного препарата.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Выявить растения с высокой лакказоподобной активностью.
2. Определить влияние некоторых эффекторов (ионов металлов и органических загрязнителей) на активность ферментов и подобрать условия для проявления их максимальной активности.
3. Подобрать условия для выделения лакказоподобных оксидаз.
4. Охарактеризовать растительные оксидазы с лакказной активностью.

**Структура бакалаврской работы:** работа состоит из списка сокращений, введения, основной части, заключения, выводов и списка используемых источников. Литературный обзор написан с использованием 26 источников, в

нем рассмотрены следующие вопросы: характеристика растительных лакказ, их распространение среди растений и методы выделения данных ферментов из растений.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** Основными объектами исследования являлись:

-проростки подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*) и сорго веничное (*Sorghum bicolor*);

-побеги и корни взрослого растения сорго веничного (*Sorghum bicolor*);

-листья взрослого растения мискантуса гигантского (*Miscanthus giganteus*), сциндапсуса золотистого (*Scindapsus aureus*) и пеларгонии зональной (*Pelargonium zonale*);

-плоды яблок (*Malus domestica*) сорта Кортланд, сливы синей (*Prunus domestica*), манго индийское (*Mangifera indica*), банана сорта Вильямс (*Musa × paradisiaca*) и хурмы кавказской (*Diospyros lotus*).

Далее в разделе были описаны основные методы, использованные в работе: получение проростков растений, получение грубых ферментных препаратов, определение лакказоподобной активности спектрофотометрическим методом, очистка ферментных препаратов при помощи диализа, аффинной и ионнообменной хроматографии и определение качества очистки с помощью неденатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле.

**Результаты и обсуждение.** На первом этапе работы был проведен скрининг лакказоподобной активности в плодах различных растений. На наличие лакказоподобной активность нами были протестированы плоды сливы, яблок, бананов, хурмы, авокадо и манго. В качестве субстрата использовали 2,6-диметоксифенол (таблица 1).

Таблица 1 – лакказоподобная активность в плодах

Растение	pH	dA/min/г биомассы
Слива синяя	6,0	$75,93 \times 10^{-2}$
Яблоки сорта Кортланд	7,0	$26,77 \times 10^{-3}$
Бананы сорта Вильямс (кожура)	5,6	$63,67 \times 10^{-3}$
Бананы сорта Вильямс (мякоть)	5,0	$15,66 \times 10^{-3}$
Авокадо	3,6	$47,12 \times 10^{-3}$
Манго индийское	7,0	$16,63 \times 10^{-3}$
Хурма кавказская	5	$53,4 \times 10^{-5}$

Как показывают данные, представленные в таблице у разных плодов пик активности наблюдается при разных значениях pH. Наибольшей активностью обладала вытяжка из сливы. У остальных плодов активность была крайне низкой. Поэтому вытяжку из плодов сливы выбрали для дальнейшей очистки.

Для ферментной вытяжки из сливы синей были подобраны оптимальные значения pH для окисления ГИ и ДМФ, которые составили 3,5-4,0 и 6,0-6,5 соответственно.

Полученную грубую вытяжку диализовали против ацетатного буфера и подвергали очистке с помощью аффинной хроматографии с конканавалином А. При этом было отмечено резкое падение активности, которое сопровождалось низким качеством разделения фракций.

Дополнительно проведенные исследования показали, что активность падает уже на следующие сутки, а через трое суток она составляла 5 -10% от первоначальной.

Учитывая полученные результаты, мы провели исследование наличия лакказоподобной активности в тканях 5-суточных проростков сорго веничного (*Sorghum bicolor L.*), ржи озимой (*Secale cereale L.*), люцерны синей (*Medicago sativa L.*), ячменя ярового (*Hordeum sativum L.*), пшеницы яровой мягкой (*Triticum aestivum*), подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus L.*) и кукурузы (*Zea mays L.*). В качестве субстратов использовали ДМФ, АБТС, ГИ (рисунок 1).

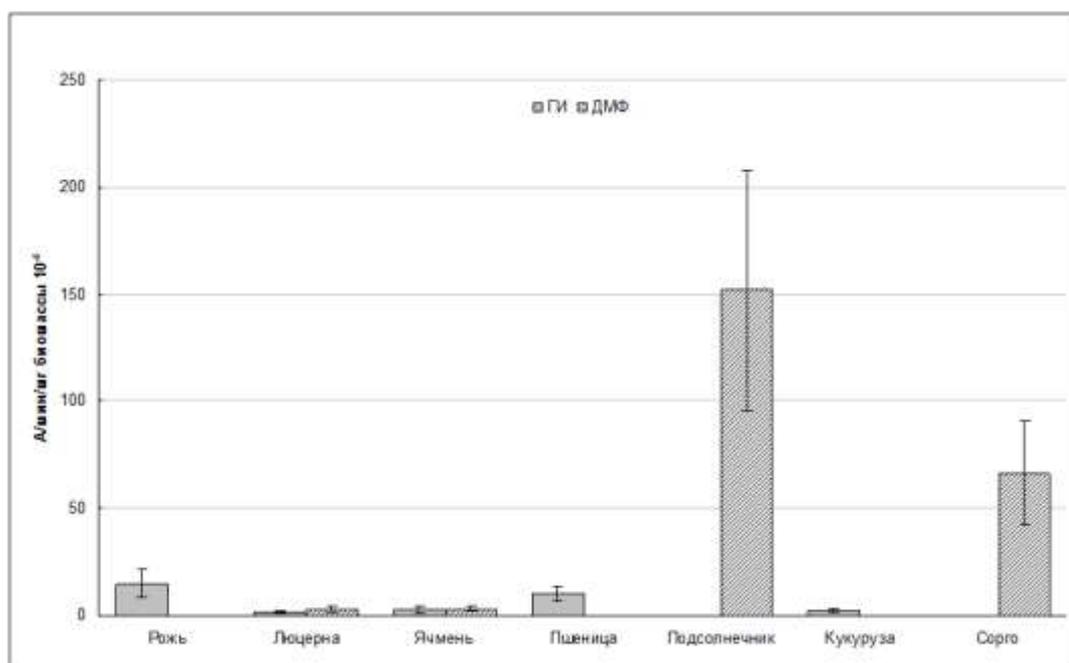


Рисунок 1 – Активность оксидаз в тканях 5-суточных проростков

Из всех растений только сорго и подсолнечник проявили заметную оксидазную активность по отношению к ДМФ, в остальных случаях активность была крайне низкой.

Учитывая низкую активность фермента и основываясь на литературных данных, мы проверили возможность повышения активности лакказоподобных оксидаз сорго и подсолнечника при помощи различных эффекторов. Для этого проростки выращивались в присутствии хлоридов Cu, Mn, Na, Cd в концентрации 1 мМ и фенантрена (Phe) в концентрации 0,25 мг/1 мл.

В присутствии солей Mn активность фермента из проростков сорго увеличивалась примерно на 16%, соли Cu и Na практически не влияли на него, а Cd и Phe снижали этот показатель (рисунок 2).

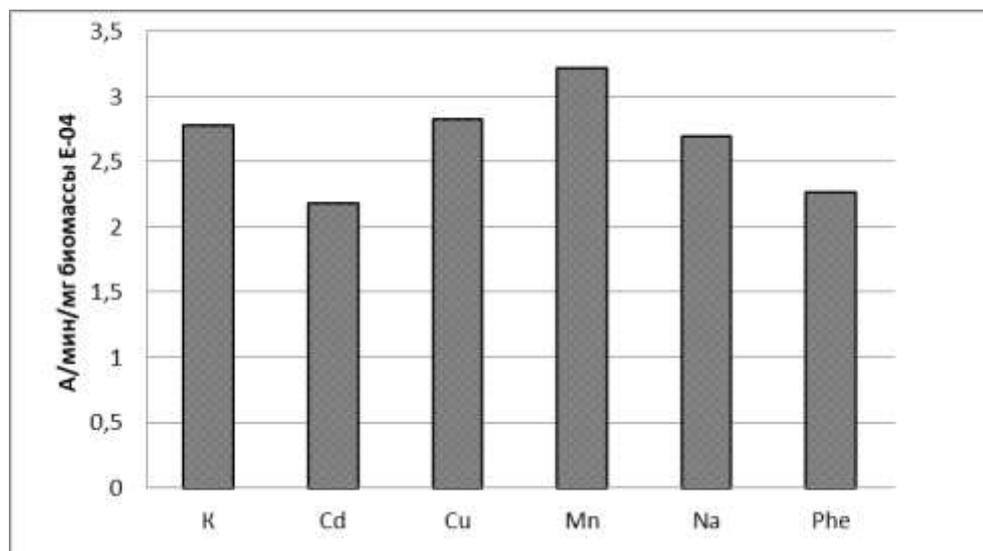


Рисунок 2 – Влияние ионов металлов и фенантрена (Phe) на оксидазную активность в тканях проростков сорго

Было показано, что активность оксидаз вытяжки из подсолнечника возрастала в той или иной степени в присутствии всех использованных эффекторов, за исключением кадмия. Максимальная активность фермента наблюдалась в присутствии марганца – почти в 5 раз выше контрольных значений (рисунок 3).

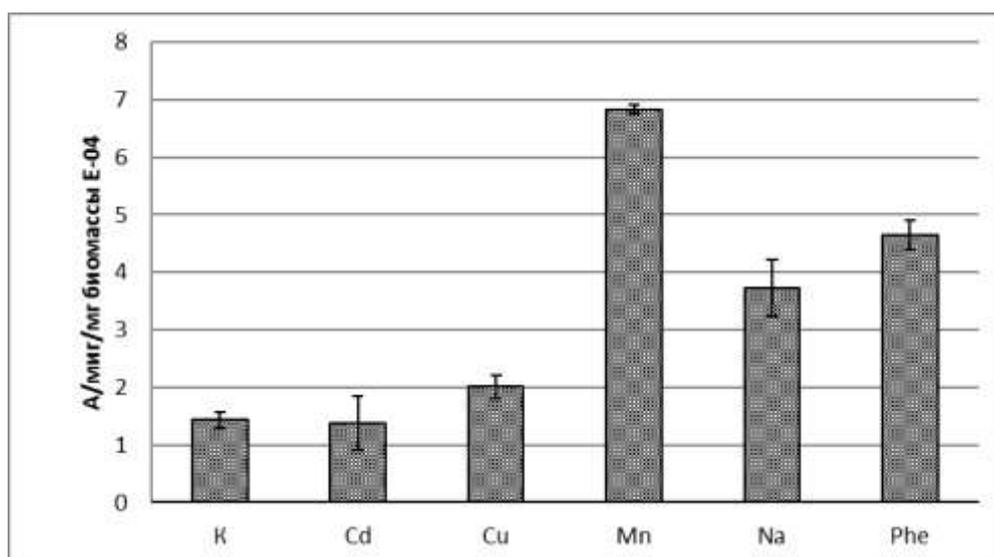


Рисунок 3 – Влияние ионов металлов и фенантрена (Phe) на оксидазную активность в тканях проростков подсолнечника.

Полученные данные делают подсолнечник и сорго достаточно перспективным

объектом для отработки методов по выделению и очистки лакказ.

Для ферментной вытяжки из проростков подсолнечника был определен оптимум рН при окислении 2,6-диметоксифенола, который составил 4,5. Однако фермент не удалось очистить методом ИОХ: Фермент не связывался с анионообменником, оксидазная активность обнаруживалась только в промывке. Поэтому для работы далее использовали растения сорго.

Так как содержание лакказ в растительных тканях невелико мы попробовали использовать более взрослые растения. В течении 1 месяца мы выращивали сорго в присутствии ионов марганца, натрия, меди, кадмия, а также нефтешлама (НШ) и НШ и кадмия одновременно. Было установлено, что в присутствии меди и натрия оксидазная активность незначительно снижалась в тканях корней и побегов, в присутствии НШ активность снижалась на два порядка. Влияние кадмия было неоднозначным: в тканях корней активность снижалась примерно на 15%, а в побегах увеличивалась, причем в присутствии НШ почти на 130 %. Марганец не оказывал влияния на продукцию растительных оксидаз.

Далее мы определили оптимум рН для оксидаз сорго, который составил 5,0. Определение активности проводили по отношению к ДМФ.

Следующим шагом была аффинная очистка полученного препарата на конканавалине А. Фракции с максимальной активностью использовали для неденатурирующего электрофореза с целью контроля качества очистки. Однако при окрашивании геля ГИ было установлено, что разделения ферментов добиться не удалось.

Так же на наличие лакказоподобной активности нами были исследованы листья некоторых многолетних растений, а именно мискантуса гиганского, сциндапсуса золотистого и пеларгонии зональной. В полученных ферментных вытяжках проверяли наличие активности в диапазоне рН от 3,6 до 7,0 с шагом 0,5. В качестве субстратов использовали гидроксиндол и диметоксифенол (рисунок 4).

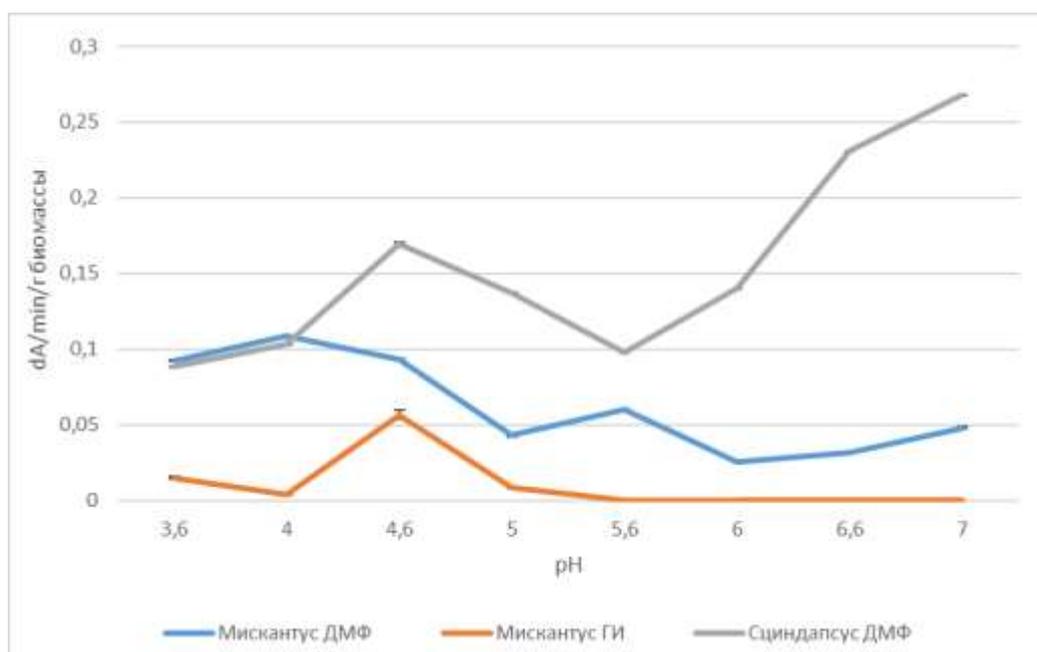


Рисунок 4 – Активность оксидаз в листьях сциндапсуса и мискантуса

Выраженная активность обнаружена в листьях мискантуса и сциндапсуса  $10,23$  и  $26,76 \times 10^{-2}$   $\Delta A / \text{мин мг}^{-1}$  влажной биомассы соответственно. В листьях пеларгонии активность была не обнаружена. В ферментной вытяжке с листьями сциндапсуса активность проявлялась только по отношению к ДМФ, максимальное значение отмечено при pH 7,0. По результатам электрофореза в ПААГ с окрашиванием ортодианизидином нам удалось получить четыре зоны активности со значениями Rf 0,02; 0,09; 0,88 и 0,93.

В листьях мискантуса максимальная активность была выявлена как по отношению к диметоксифенолу, так и к гидроксииндолу. В случае с диметоксифенолом максимальное значение активности наблюдается при pH 4,0, а в случае с гидроксииндолом при pH 4,6. В нативном ферментном препарате из мискантуса при электрофорезе в ПААГ выявлялось 5 зон активности со значениями Rf 0,19; 0,3; 0,35; 0,46 и 0,54.

Затем была проведена многоступенчатая очистка нативной вытяжки мискантуса, включающая аффинную хроматографию на ConA, концентрирование и гель-фильтрацию.

Фракции, проявившие максимальную активность далее были

использованы для последующей гель-фильтрации, в которой ряд фракций представляли собой электрофоретически гомогенный препарат. По данным гель-фильтрации примерный молекулярный вес фермента равен 74 кДа. Его оптимум рН по отношению к ДМФ 5,0-5,5, к ГИ – 4,5. В связи с невысоким выходом, активностью препарата и сезонностью роста мискантуса не удалось получить других характеристик фермента. Однако отработанный метод очистки фермента может быть использован в дальнейшем.

Таким образом, нами были выявлены растения с высокой лакказоподобной активностью и отработаны методики по их выделению. Мы проверили влияние некоторых эффекторов на активность ферментов, для некоторых лакказоподобных оксидаз подобрали условия для выделения и охарактеризовали их.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, в результате проведенной работы было установлено, что выраженной лакказной активностью обладают сорго, подсолнечник, мисканус и сциндапус, кроме того, она обнаруживалась в плодах сливы. Активность ферментов увеличивалась при выращивании сорго в условиях комплексного загрязнения почвы нефтешламом и Cd более чем в два раза. Выраженный положительный эффект на активность оксидаз в проростках подсолнечника наблюдался в присутствии Na, Phe и Mn, активность ферментов увеличивалась примерно в 2, 3 и 5 раз соответственно.

С использованием ИОХ из проростков сорго был получен препарат (Rf 0,63), обладающий лакказной активностью, для которого был определен субстратный спектр и оптимум рН. В неденатурирующем электрофорезе в ПААГ в вытяжке из проростков подсолнечника и в очищенном препарате была выявлена зона оксидазной активности с Rf 0,167. В результате многоступенчатой очистки из листьев мискануса был получен электрофоретически гомогенный препарат (Rf 0,19), обладающий оксидазной активностью отношению к 2,4-диметоксифенолу и 4-гидроксииндолу, для этих

субстратов был определен оптимум pH и примерная молекулярная масса фермента. Ферментную вытяжку из плодов сливы, проявляющую лакказоподобную активность, не удалось разделить использованными нами методами, и исходный препарат, и полученный в результате многоступенчатой очистки содержал две зоны оксидазной активности ( $R_f$  0,4 и 0,54).

### ВЫВОДЫ

1. Лакказоподобная активность вытяжки из проростков сорго и подсолнечника зависит от присутствия эффекторов. У сорго активность ферментов увеличивалась при одновременном присутствии нефтешлама и хлорида кадмия более чем в два раза. В проростках подсолнечника в присутствии солей Na, Mn и фенантрена, активность ферментов увеличивалась примерно в 2, 5 и 3 раза соответственно.
2. Оптимум pH ферментного препарата из проростков сорго составляет 5,0 при окислении 2,6-диметоксифенола.
3. Получен электрофоретически гомогенный препарат из листьев мискантуса ( $R_f$  0,19), обладающий оксидазной активностью по отношению к 2,6-диметоксифенолу и 4-гидроксииндолу с оптимумами pH 5,0-5,5 и 4,5 соответственно. Молекулярная масса фермента по данным аналитической гель-фильтрации составляет 74 кДа.

