

ЛИПОКСИГЕНАЗНАЯ СИСТЕМА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ *TRITICUM AESTIVUM*

И. А. ОГАНЕСЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация — Исследованы кинетические свойства липоксигеназы 7-ми сортов пшеницы вида *Tr. aestivum* в зависимости от ее изоферментного состава. Установлено, что липоксигеназа пшеницы катализирует только реакцию образования конъюгированных гидроперекисей жирных кислот и не обнаруживает активности в реакции сопряженного окисления каротиноидов, что объясняется особенностями изоферментного состава.

Անոտացիա — Ուսումնասիրվել են *Tr. aestivum* ցորենի 7 տեսակների լիպոքսիգենազայի կինետիկ հատկությունները՝ կախված նրա իզոֆերմենտային բաղադրությունից: Գտնվել է, որ ցորենի լիպոքսիգենազան կատալիզում է միայն հարապիթոսների նարակցված հիդրոպերօքսիդների առաջացման ռեակցիան, իսկ կարոտինոիդների լծորդված սթրոչացման ռեակցիաները չի կատալիզում, որն էլ բացատրվում է իզոֆերմենտային բաղադրության առանձնահատկություններով:

Abstract — The kinetic properties of lipoxygenase of 7 sorts of *Tr. aestivum* wheat are investigated in dependence on their isoenzymatic composition. The wheat lipoxygenase catalyzes only the reaction of conjugated hydroperoxidation of the fatty acids and does not reveal activities in the reaction of connected oxidation of the carotenoides. This is due to the peculiarities of the isoenzymatic composition of the wheat lipoxygenase.

Ключевые слова пшеница, липоксигеназа, изоферменты.

Перекисное окисление липидов (в частности, полиненасыщенных жирных кислот) является естественным процессом, благодаря которому осуществляется обмен липидов клеточных мембран, поддержание их структурной целостности и функциональной активности [1, 10]. Специфической ферментной системой, катализирующей реакцию перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот молекулярным кислородом, является липоксигеназа (ЛОГ, линолеат: O₂-оксидоредуктаза) [3, 10].

Несмотря на широкое распространение и важную роль этой ферментной системы в растительном и животном организмах, ее структура, механизм действия и физиологическая роль изучены недостаточно [3, 13]. Показан сложный изоферментный состав ЛОГ, определяющий направленность реакций перекисного окисления жирных кислот в зависи-

мости от условий среды и субстрата [10]. Наиболее изученным является фермент из соевых бобов, тогда как ЛОГ таких культур, как пшеница, мало исследована. Работы по ЛОГ пшеницы немногочисленны, результаты их разноречивы [9, 14]. Исследование этого фермента у пшеницы представляет интерес также в связи с его применением в хлебопекарном производстве [4].

В настоящей работе впервые проведено детальное исследование липоксигеназных систем пшеницы в зависимости от ее изоферментного состава.

Материал и методика. Объектом исследований служили семена пшеницы (урожай 1981 г.) вида *T. aestivum* следующих сортов: Саратовская-29, Альбидуа-13, Кюлей-353, Пеньямо-62, Сонора-64, Эритроспермум-10, Безостая-1.

Очищенные препараты ЛОГ из семян выделяли по схеме, включающей обезжиривание материала охлажденным ацетоном, экстрагирование белков фосфатным буфером, дифференциальное центрифугирование и фракционирование белков сернокислым аммонием с последующей хроматографией на колонках с сефадексами G-50 и G-150 [2, 6]. Активность фермента определяли спектрофотометрически по реакции сопряженного окисления β -каротина в присутствии субстрата или по реакции ферментативного образования гидроперекисей жирных кислот, регистрируемых при 232 нм [11]. В качестве субстратов использовали свежеприготовленную натриевую соль линолевой, линоленовой и эрахионовой кислот, а также раствор метиллинолеата. За удельную активность фермента принимали изменение оптической плотности на 0,001, внесенное к 1 мг белка за 1 минуту. Белок определяли по Лоури [11].

Изоферментный состав ЛОГ пшеницы определяли методом Хейл и соавт., основанного на свойстве фермента образовывать окрашенный подкрасильный комплекс в присутствии подкрасителя калия и перекисей жирных кислот [9].

Результаты и обсуждение. Применяемая нами схема очистки фермента позволила получить препараты ЛОГ, полностью очищенные от сопутствующих белков с сохранением изоферментного спектра ЛОГ. Этот принцип очистки фермента выдерживался в течение всей работы, так как, по литературным данным, изменение соотношения изоферментов в липоксигеназной системе растений приводит к изменению ее кинетических свойств [12–14].

Используя 2 метода определения активности фермента, мы обнаружили высокую активность его независимо от сорта пшеницы только в реакции перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот с образованием гидроперекисей, регистрируемых при 232 нм [6] (рис. 1). Характерной особенностью ЛОГ пшеницы вида *T. aestivum* является отсутствие способности вызывать окисление каротиноидов — свойство, характерное для ЛОГ бобовых растений [7]. Чем же обусловлено это различие между указанными ферментными системами пшеницы и бобовых растений?

Исследование методом диск-электрофореза в ПААГ показало гетерогенность липоксигеназных систем из семян пшеницы, имеющих в своем составе до 4-х изоферментов с идентичными значениями электрофоретической подвижности ($R_f = 0,14–0,15; 0,18–0,20; 0,24–0,25$ и $0,29–0,32$). В составе ЛОГ пшеницы этого вида не выявлены изоферменты, катализирующие сопряженное окисление каротиноидов и характеризующие у бобовых растений величинами $R_f = 0,37–0,50$ [6, 7].

Учитывая специфичность липоксигеназных систем пшеницы в дальнейшем, мы изучали кинетические характеристики этого фермента в реакции с образованием конъюгированных гидроперекисей.

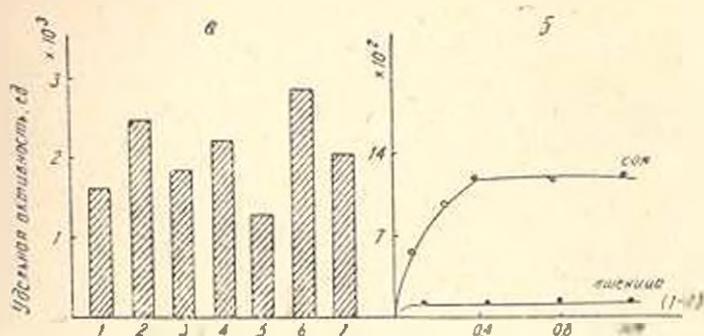


Рис. 1. Активность ЛЮГ из семян пшеницы в реакциях образования конъюгированных гидроперекисей арахидиновой кислоты (а) и сопряженного окисления каротиноидов в присутствии арахидиновой кислоты (б). Сорты: 1. Пеньямо-62, 2. Софора-64, 3. Конлей-353, 4. Эритроспермум-10, 5. Альбидум-43, 6. Саратовская-29, 7—Безостая-1.

Активность ЛЮГ пшеницы определяли при рН реакционной среды, равной 4,0—10,5. Как видно из рис. 2, ее максимальная активность проявляется при рН 7,0—8,0 в зависимости от сорта пшеницы. В отличие от ЛЮГ пшеницы фермент из бобовых растений имеет 2 оптимума рН (6,5 и 9,0), которые соответствуют двум липоксигенажным системам из бобовых растений (каротинокисляющей и образующей гидроперекиси) [10].

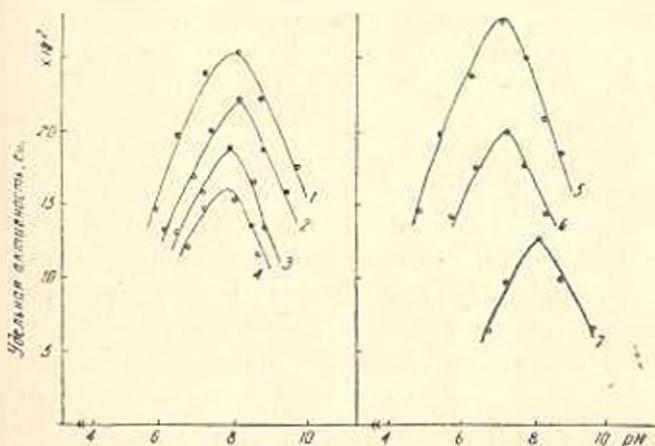


Рис. 2. Зависимость активности липоксигеназы пшеницы от рН реакционной среды. Сорты: 1—Софора-64, 2. Эритроспермум-10, 3. Конлей-353, 4. Пеньямо-62, 5. Саратовская-29, 6. Безостая-1, 7. Альбидум-43.

При исследовании субстратной специфичности ЛЮГ пшеницы в реакции окисления линолевой, линоленовой, арахидиновой кислот и метиллинолеата было обнаружено, что ЛЮГ пшеницы с максимальной скоростью катализирует реакцию окисления линолевой кислоты и практически не активна в реакции окисления метиллинолеата (рис. 3). В отличие от ЛЮГ пшеницы, ферментная система бобовых растений проявля-

еет достаточно высокую окислительную активность и по отношению к метиллинолеату [7], что свидетельствует о различиях в субстратной специфичности.

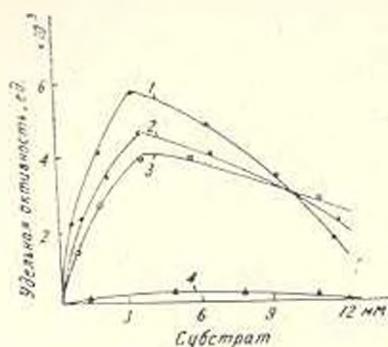


Рис. 3.

Рис. 3. Активность липоксигеназы из семян пшеницы сорта Саратовская-29 в реакции перекисного окисления линолевой (1), линоленовой (3), арахидоновой (2) кислот и метиллинолеата (4).

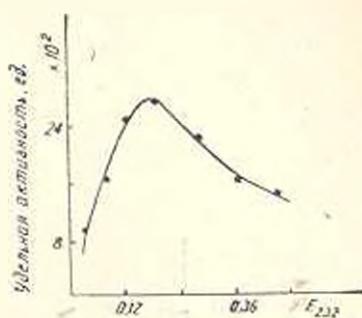


Рис. 4.

Рис. 4. Влияние концентрации гидроперекисей и реакционной среде на активность липоксигеназы из семян пшеницы сорта Саратовская-29.

Установлено, что внутриклеточным регулятором активности ЛОГ является не только состав изоферментов, но и концентрация субстратов, особенно при патологических состояниях [8, 10]. Как видно из рис. 3, высокие концентрации субстратов (выше 4,5 мМ) ингибируют активность липоксигеназной системы пшеницы. Аналогичный эффект был обнаружен у ЛОГ бобовых растений, ингибирование которых, однако, происходило при более низких концентрациях субстратов [3]. На основании полученных данных и литературных сведений можно предположить, что при патологических состояниях в тканях и клетках пшеницы активность ЛОГ сохраняется дольше, чем у бобовых растений, что, видимо, обусловлено особенностями обмена веществ пшеницы и связано с высокой устойчивостью ее к воздействию экстремальных факторов.

При изучении активности ЛОГ во времени было обнаружено наличие лаг-периода, который, видимо, связан с активирующим действием низких концентраций образующихся в ходе реакции гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот на ферментную систему. При более высоких концентрациях гидроперекиси ингибируют активность ЛОГ (рис. 4). Видимо, низкие концентрации гидроперекисей необходимы для активации ЛОГ и начальный период реакции. Высокие концентрации гидроперекисей, ингибируя фермент, регулируют активность его и предохраняют организм от накопления продуктов перекисного окисления липидов, токсичных для организма [1].

Таким образом, в отличие от ЛОГ бобовых растений, липоксигеназная система пшеницы вида *T. aestivum* не катализирует реакцию сопряженного окисления каротиноидов. Это объясняется различиями в изоферментном составе ЛОГ пшеницы и бобовых растений и связано с отсутствием в составе ЛОГ пшеницы изоферментов, катализирующих эту реакцию и имеющих центр связывания каротиноидов. Особенности

изоферментного состава ЛОГ пшеницы в какой-то мере сказываются и на кинетических характеристиках этой ферментной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975.
2. Борисова И. Г., Оганесян Н. А., Будницкая Е. В. Мат-лы I Всесоюз. конф. по применению хроматографии в биология и медицине, 7—8, М., 1983.
3. Будницкая Е. В. Успехи биологической химии, 22, 152—166, 1982.
4. Крстович В. Л. Биохимия зерна. М., 1981.
5. Оганесян Н. А. Биолог. ж. Армении, 35, 2, 156—157, 1983.
6. Оганесян Н. А., Борисова И. Г., Солохатин Д. А., Будницкая Е. В. Докл. АН СССР, 269, 4, 1002—1005, 1983.
7. Чепуренко Н. В., Будницкая Е. В., Борисова И. Г. Биохимия, 43, 4, 602—608, 1978.
8. Borisova I. G., Oganestian N. A., Boudnitskaya E. V. 16th World Congress of the International Society for Fat Research, Budapest, Abstracts of paper, 35, 1983.
9. Hale S. A., Richardson T., Von Elbe J. H., Hagedorn D. J. Lipids, 4, 3, 209—215, 1969.
10. Gaillard T., Chen H. W. S. In: Biochemistry of Plants, New York, 4, 131—161, 1980.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chemistry, 193, 1, 265—275, 1951.
12. Nicolas J., Aufran M., Drapron R. J. Sci. Food Agric., 33, 4, 365—372, 1982.
13. Schewe T., Wlasner R., Rapoport S. M. In: Methods in Enzymology, New York, 71, 430—441, 1981.
14. Wallace J. M., Wheeler E. L. J. Agric. Food Chem., 23, 2, 146—150, 1975.

Поступила 30.X 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 12, с. 1005—1008, 1986

УДК 551.331.2

ОБ УЛЬТРАСТРУКТУРЕ КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛ МЕГАСПОРОЦИТА, МЕГАСПОР И ЖЕНСКОГО ГАМЕТОФИТА *PERSICA VULGARIS* MILL.

А. И. БАХШИНИЯН, Д. И. ЧОЛАХЯН, Л. Х. АБРАМЯН

Ереванский государственный университет, кафедра генетики и цитологии

Аннотация — Описано ультратонкое строение клеточных органелл мегаспороцита, мегаспора, а также зародышевого мешка персика до дифференциации. Исследованы процессы мегаспорогенеза и мегagamетогенеза и ряд отклонений от нормы.

Սեղանադրա — նկարագրվել է զննելի մեգասպորոցիտի, մեգասպորի և սաղմնապարկի մեջ գրգռվածքում ունեցած բոլորից օրգանիկների սլաբարարակ կառուցվածքը: Ուսումնասիրվել են մեգասպորոգենեզը և մեգագամետոգենեզը ու մի շարք չեզոքումներ ներմայրց:

Abstract — The ultrastructure of the cell organelles of the megasporocyte, megaspore and embryo sack in the peach before differentiation is described. The process of megasporogenesis, megagametogenesis and a number of deviations from standard form is investigated.