

УДК 543.94:582.29

К ВОПРОСУ О КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИШАЙНИКОВ

Бойцова Т.А., Паламарчук И.А., Бровко О.С., Вальчук Н.А.,
Слобода А.А., Жильцов Д.В.

Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаврова Российской академии наук, Архангельск, e-mail: valchuk.natalia@mail.ru

Каталаза – фермент широко распространенный в тканях живых организмов, в том числе и в слоевищах лишайников. Высокая скорость реакции при участии этого фермента необходима для удаления активного кислорода, чтобы предохранить компоненты клеток от окислительного стресса, поэтому каталаза принадлежит к числу наиболее интенсивно изучаемых ферментов. В статье кратко охарактеризованы различные методы определения каталазной активности: газометрический, химические методы (титриметрический, колориметрический) и полярографический, отмечены их достоинства и недостатки. Приведена подробная методика спектрофотометрического определения активности каталазы. Метод основан на воздействии каталазы на пероксид водорода и измерении ультрафиолетового поглощения пероксида водорода при 240 нм. Объектами исследования выбраны два вида кустистых лишайников, распространенных в биотопах Северо-Западного региона России. Из почвенных лишайников изучался вид Кладония (*Cladonia stellaris*), из эпифитных – Уснея (*Usnea florida*). Сбор материала производился в весенний и летний периоды 2016 г. на территории Устьянского района Архангельской области на три пробных площадках в сосняках-брусничниках одинакового состава древесной, произрастающих на серых лесных почвах. Средняя активность каталазы в полученных ферментативных вытяжках оценивалась кинетическим методом по начальной скорости реакции ферментативного окисления пероксида водорода в течение 30 секунд в расчете на 1 г сухой массы лишайника (е.о.п./с·г). Полученные экспериментальные данные были обработаны с помощью методов математической статистики. Подобраны оптимальные условия для определения активности каталазы в лишайниках. Изучена активность каталазы в весенне-летний периоды и влияние длительного хранения образцов на активность каталазы. Показано, что спектрофотометрический метод позволяет определить активность каталазы в свежесобраных образцах лишайников с относительной погрешностью 2,1%. Высказано предположение, что благодаря взаимосвязи хитин-глюканового комплекса с ферментом возможна стабилизация каталазы.

Ключевые слова: активность каталазы, лишайники, спектрофотометр, хитин-глюкановый комплекс

TO THE QUESTION OF CATALASE ACTIVITY IN LICHENS

Boitsova T.A., Palamarchuk I.A., Brovko O.S., Valchuk N.A., Sloboda A.A., Zhiltsov D.V.

N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research, Arkhangelsk, e-mail: valchuk.natalia@mail.ru

Catalase is an enzyme widely distributed in the tissues of living organisms, including the thalli of lichens. A high reaction rate with the participation of this enzyme is necessary to remove active oxygen in order to protect the components of cells from oxidative stress, that's why catalase is one of the most intensively studied enzymes. The article briefly describes various methods for determining catalase activity, such as gasometric, chemical (titrimetric, colorimetric) and polarographic methods, their advantages and disadvantages are noted. The detailed procedure for the spectrophotometric determination of catalase activity is given. The method is based on the effect of catalase on hydrogen peroxide and measurement of ultraviolet absorption of hydrogen peroxide at 240 nm. The objects of research are two species of bushy lichens, which are common in the biotopes of the North-West region of Russia. From the soil lichens, the species *Cladonia stellaris* was studied. From the epiphytic lichens, the species *Usnea florida* was studied. The material was collected from the 3 test plots in the spring and summer periods of 2016 on the territory of the Ustyanskiy district of the Arkhangelsk region in the pine-bilberry forest stands with the same composition, growing on gray forest soils. The average catalase activity in the obtained enzymatic extracts was estimated by the kinetic method based on the initial reaction rate of the enzymatic oxidation of hydrogen peroxide for 30 seconds per 1 g of dry lichen mass (OD units s⁻¹g⁻¹). The obtained experimental data were processed using methods of mathematical statistics. Optimal conditions for the determination of catalase activity in lichens were selected. The activity of catalase in spring and summer periods and the effect of long-term storage of samples on catalase activity were studied. It is shown that the spectrophotometric method allows to determine the activity of catalase in freshly picked lichen samples with a relative error of 2.1%. It is suggested that due to the interrelation between the chitin-glucan complex and the enzyme, catalase stabilization is possible.

Keywords: catalase activity, lichens, spectrophotometer, chitin-glucan complex

В последние годы, как в России, так и за рубежом активно ведутся исследования механизмов образования активных метаболитов кислорода и их роли в биологических системах, что подтверждается наличием огромного количества выпускаемых публикаций [1, 2]. Накопление активных форм кислорода и развитие окислительных процессов сдерживает мощная систе-

ма антиоксидантной защиты, включающая низкомолекулярные антиоксиданты и ферменты [2]. Важнейшим ферментом первой линии антиоксидантной защиты является супероксиддисмутаза (СОД), которая катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала. В результате работы СОД образуется пероксид водорода. Основным внутриклеточным ферментом,

который разлагает токсичный для клеток пероксид водорода на воду и молекулярный кислород, является каталаза, работающая в составе второй линии защиты. Этот фермент обладает абсолютной субстратной специфичностью, то есть способен взаимодействовать только с одним строго определенным субстратом – пероксидом водорода. Каталаза известна как фермент, очень сильно ускоряющий реакцию. Одна молекула каталазы может расщепить до 40 миллионов молекул пероксида водорода в секунду. Такая высокая скорость реакции необходима для удаления активного кислорода, чтобы предохранить компоненты клеток от окислительного действия, поэтому каталаза принадлежит к числу наиболее интенсивно изучаемых ферментов [2].

Каталаза широко распространена в тканях животных, растений и микроорганизмах, за исключением облигатных анаэробов. В тканях живых организмов она обладает довольно высокой активностью, в том числе и в слоевищах лишайников [3, 4]. Изменение активности каталазы лишайников является в некоторой степени показателем реакции растительного организма на комплекс как абиотических, так и техногенных воздействий.

Известны различные методы определения активности каталазы: газометрический по Варбургу, химические методы (титриметрический по А.Н. Баху и А.И. Опарину, в котором остаточный пероксид водорода титрируется с перманганатом или избыток перманганата измеряется колориметрически [5]). Известна также спектрофотометрическая методика измерения активности каталазы в биологических жидкостях, основанная на способности пероксида водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [6]. Полярнографический метод [7] достаточно точный, однако требует специального оборудования, работа которого сопряжена с применением химически вредных соединений. Все эти методы не затрагивают быстрого реакционного периода, который длится меньше минуты, и имеют ряд недостатков. При газометрическом методе требуется учитывать постоянную объема сосуда, необходимы приспособления для механического взбалтывания прибора. Недостатками титриметрического способа являются необходимость постоянной проверки титров перманганата калия и пероксида водорода, кроме того, для окрашенных растворов трудно определить окончание титрования. В целом вышеперечисленные методы

достаточно сложны и трудоемки, требуют использования дополнительных реагентов или специального оборудования. Кроме того, для каждого исследуемого объекта требуется адаптация применяемой методики сообразно его особенностям.

Мы для своих исследований выбрали простой в аппаратном исполнении и чувствительный спектрофотометрический метод. Метод основан на взаимодействии каталазы с пероксидом водорода и дальнейшем измерении кинетики реакции ферментативного окисления. Цель работы: оптимизация и корректировка спектрофотометрического метода определения активности каталазы для лишайников.

Материалы и методы исследования

Активность ферментов, участвующих в обмене веществ и находящихся в микробите лишайников, неодинакова и зависит от видовых особенностей [2], поэтому объектами исследования выбраны два вида кустистых лишайников, наиболее распространенных в биотопах Северо-Западного региона России. Из почвенных лишайников изучался вид *Cladonia stellaris*, из эпифитных – *Usnea florida*. Отбор образцов лишайников производился в весенний и летний периоды 2016 г. на территории Устьянского района Архангельской области на три пробных площадках (на каждой два участка) в сосняках-брусничниках с одинаковым составом древостоя. Пробы лишайников отбирались весом 100–150 г на пяти равноудаленных точках одного участка в сухую, недождливую погоду. В лаборатории образцы очищали с помощью пинцета от посторонних загрязнителей (мхов, хвоя и пр.), обмывали деионизированной водой для удаления с поверхности пылевидных частиц и высушивали до воздушно-сухого состояния. Поскольку природный материал неоднороден и очень вариабелен, обращали особое внимание на его усреднение. Подготовленные пробы упаковывали в бумажные пакеты и хранили до начала химического анализа в сухом помещении при комнатных условиях. Для анализа отбирались преимущественно целые, неповрежденные, наиболее крупные слоевища. Такие талломы считаются условно взрослыми. Определение видов лишайников проводилось по стандартным методикам с использованием определителя [8].

Активность каталазы изучали на спектрофотометре UV-1800, Shimadzu. Навеску растительного материала около 200 мг рас-

тирала в фарфоровой ступке с небольшим количеством фосфатного буфера (0,05 М, рН 7), количественно переносили в мерную колбу на 25 см³, доводили буферным раствором до метки. Полученный экстракт каталазы настаивали в течение 10 минут, затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 минут.

Активность каталазы в полученных вытяжках оценивалась кинетическим методом по начальной скорости реакции ферментативного окисления пероксида водорода в течение 30 секунд в расчете на 1 г сухой массы лишайника (*e.o.n./c·г*). В кювету спектрофотометра (длина оптического пути 1 см) вносили 2 см³ ферментной вытяжки и 1 см³ раствора пероксида водорода концентрацией 30 мМ, а в кювету сравнения – 2 см³ ферментной вытяжки и 1 см³ фосфатного буферного раствора. Оптическую плотность растворов во времени измеряли при длине волны 240 нм. Экспериментальные результаты обработаны методами математической статистики. В ходе обработки определялись: средние арифметические величины, стандартное отклонение, стандартная ошибка средней арифметической. При определении уровня достоверности полученных данных применялся критерий Стьюдента, так как он вполне адекватен всем аспектам исследований. Обработку проводили при доверительной вероятности $P = 0,95\%$, объем выборки за 2016 г. составил 36 значений, за 2017 г. – 36 значений.

Результаты исследования и их обсуждение

В литературе приведены методики определения каталазной активности различными методами для различных объектов исследования: почвы, растения, биологические жидкости. Мы в своих исследованиях за основу выбрали спектрофотометрические методики, приведенные в работах [9, 10].

За ходом ферментативной реакции следили по расходу субстрата – H₂O₂, спектр поглощения которого находится в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм. Продукты реакции, кислород и вода, не поглощают свет в этой спектральной области, поэтому поглощение в ультрафиолете (240 нм) – это точное измерение концентрации H₂O₂ в реакционной системе: каталаза – пероксид водорода.

В буферированной ферментативной вытяжке лишайников могут присутствовать и другие соединения (водорастворимые фенолы, пигменты и др.), которые могут вносить погрешность в измерение содержа-

ния пероксида водорода. Для учета влияния собственной окраски экстрактов в качестве раствора сравнения использовали буферированный раствор экстракта без пероксида водорода. Чтобы минимизировать погрешность результатов, разведение пробы подбирали так, чтобы измеряемая оптическая плотность попадала в диапазон значений 0,5–1,0. Активность каталазы проявляется в диапазоне рН от 5 до 11, причем оптимум находится при рН 6,5–8,5, при котором и изучалась ферментативная реакция.

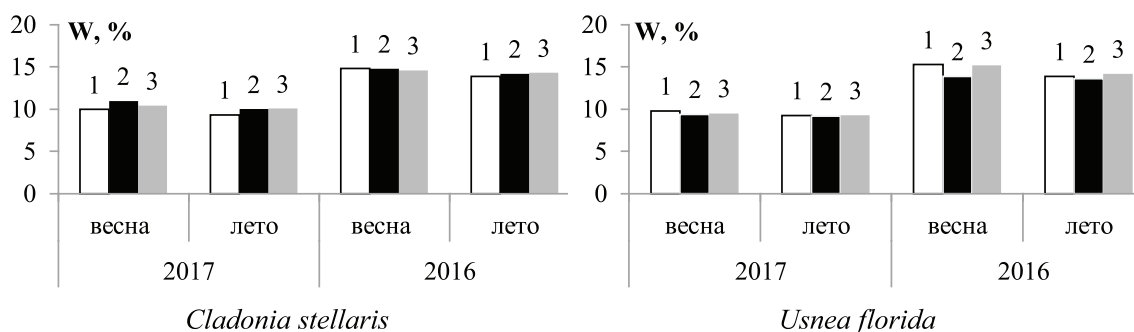
В таблице приведены средние значения каталазной активности лишайников *Cladonia stellaris* и *Usnea florida* с доверительным интервалом. Каталазную активность в лишайниках определяли в свежемозрелых образцах (2016 г.) и через год хранения (2017 г.). Показано, что спектрофотометрический метод позволяет определить активность каталазы в свежемозрелых образцах лишайников с относительной погрешностью 2,1%. Анализ сезонной динамики каталазной активности показал незначительное увеличение этого показателя в летний период. По-видимому, небольшое снижение влажности в летний период (рисунок) в образцах лишайников распознается растением как стресс и является его защитной реакцией к сохранению гомеостаза, при этом активность каталазы незначительно возрастает. Эта тенденция наблюдается для двух видов проанализированных лишайников (таблица). Кроме того для каталазной активности лишайников наблюдается видовая изменчивость и зависимость от природных условий произрастания (3 различные по условиям пробные площадки), причем различия несколько сглаживаются при длительном хранении образцов.

Одной из важных и интересных особенностей лишайников является их способность находиться в сухом состоянии на протяжении длительного времени. При этом они не погибают, а всего лишь временно приостанавливают свои жизненные функции до первого увлажнения. Как показано в таблице, каталазная активность лишайников значительно снижается при длительном хранении, относительная погрешность метода составила 2,7%.

Известно, что каталаза относится к ферментам, которые наиболее длительно сохраняют свою высокую активность. Скорость реакции этого фермента лимитируется лишь скоростью диффузии субстрата к активному центру. В нашем эксперименте потеря влаги за год хранения значительна и составляет около 30% (рисунок).

Каталазная активность образцов лишайников (*e.o.n/c-г*)

Пробные площадки	<i>Cladonia stellaris</i>		<i>Usnea florida</i>	
	весенний период	летний период	весенний период	летний период
анализ выполнен в 2016 г.				
1	13,02 ± 0,46	14,79 ± 3,85	9,16 ± 0,47	10,86 ± 3,70
2	16,71 ± 0,04	18,53 ± 1,42	10,66 ± 1,23	13,79 ± 1,54
3	5,29 ± 1,84	7,63 ± 0,35	5,98 ± 0,17	6,69 ± 1,69
средняя относительная погрешность – 2,1%				
анализ выполнен в 2017 г.				
1	0,55 ± 0,03	0,73 ± 0,10	0,73 ± 0,04	1,54 ± 0,08
2	1,02 ± 0,26	1,24 ± 0,25	1,05 ± 0,03	2,25 ± 0,33
3	0,36 ± 0,08	0,38 ± 0,04	0,84 ± 0,03	0,87 ± 0,14
средняя относительная погрешность – 2,7%				



Изменение влажности лишайников в процессе хранения

Можно предположить, что каталаза долгое время сохраняет свою активность и стабильность даже в условиях, неблагоприятных для жизнедеятельности, благодаря иммобилизации с хитин-глюкановым комплексом (ХГК) «клеточной стенки» таллома лишайника.

Лишайники представляют собой особую группу живых организмов, тело (таллом) которых представляет собой связнодисперсную капиллярно-пористую полимерную матрицу, построенную из полисахаридных компонентов различной структуры. Основными соединениями клеточной стенки грибов (грибной компонент составляет 90–98% биомассы таллома) являются полисахариды, представленные разветвленными глюканами и хитином, которые образуют ХГК. Внутриклеточные ферменты, в том числе каталаза, представляют собой коллоидные частицы и входят в состав клеточной стенки микобионта. Изменение структуры клеточной стенки лишайников (потеря влаги, набухание и др.) влияют на активность фермента и скорость ферментативных реакций.

Ранее была показана способность анионных пероксидаз пшеницы связываться с хитином [11], что подводит к мысли о наличии таких свойств у пероксидаз, а возможно, и каталаз у других видов растений. Исследования, проведённые различными авторами, показывают, что методом направленной иммобилизации фермента с полисахаридами получают значительно более стабильные, а в некоторых случаях и более активные препараты фермента. Из полисахаридов и их производных наибольшую стабильность и активность иммобилизованного ферментного препарата обеспечивает производное хитина – хитозан, как отдельный полисахарид, так и в составе интерполиэлектролитного комплекса [12, 13].

Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что каталаза стабилизируется при контакте с ХГК. Активность фермента во времени зависит от содержания воды в слоевище. Потеря влаги при длительном хранении значительно снижает активность фермента, а незначительное снижение влажности при

сезонной изменчивости повышает каталитическую активность фермента и является защитной реакцией лишайников на стресс.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО России в рамках научного проекта комплексной программы УрО РАН № 15-2-5-34 «Новые подходы к комплексной оценке состояния и эволюции лесных и болотных экосистем западного сегмента Арктики» на оборудовании ЦКП КТ РФ «Арктика» ФИЦКИА РАН.

Список литературы

1. Corpas F.J. What is the role of hydrogen peroxide in plant peroxisomes // *Plant Biology*. – 2015. – vol. 17, № 6. – P. 1099–1103.
2. Pei J., Wang H., Wu L., Xia S., Xu C., Zheng B., Li T., Jiang Y. Biochemical characterization of a catalase from *Vibrio vulnificus*, a pathogen that causes gastroenteritis // *Acta Biochimica Polonica*. – 2017. – vol. 64. – P. 1–7.
3. Molnar K., Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: A review // *Z. Naturforsch.* – 2010. – vol. 65. – P. 157–173.
4. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2010. – vol. 48. – P. 909–930.
5. Соловьев В.Б. Практикум по энзимологии: учебно-методическое пособие / В.Б. Соловьев. – Пенза, 2007. – 52 с.
6. Aebi H. Catalase in vitro // *Methods in enzymology*. – 1984. – vol. 105. – P. 121–126.
7. Weissman L., Garty J., Hochman A. Characterization of Enzymatic Antioxidants in the Lichen *Ramalina lacera* and Their Response to Rehydration // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – vol. 71, № 11. – P. 6508–6514.
8. Голубкова Н.С. Определитель лишайников России. Выпуск 10 / Н.С. Голубкова. – СПб.: Наука, 2008. – 515 с.
9. Beers R.F., Sizer I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // *Journal of Biological Chemistry*. – 1952. – vol. 195, № 1. – P. 133–140.
10. Balasubramanian M., Nirmala P. Evaluation of antioxidant properties of Foliose lichens // *Journal of Chemical and Pharmaceutical research*. – 2014. – vol. 6, № 9. – P. 177–184.
11. Максимов И.В. Влияние хитоолигосахаридов на состав изоферментов пероксидазы в совместной культуре каллусов пшеницы с возбудителем твердой головни / И.В. Максимов, Е.А. Черепанова, О.Б. Сурина // *Физиология растений*. – 2010. – Т. 57, № 1. – С. 131–138.
12. Веселова И.А. Повышение каталитической активности и стабильности пероксидазы хрена за счет включения

ее в полиэлектrolитный комплекс с хитозаном / И.А. Веселова, А.В. Кирейко, Т.Н. Шеховцова // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2009. – Т. 45, № 2. – С. 143–148.

13. Влияние ионной силы раствора на процесс комплексообразования сульфопроизводных биополимера лигнина и хитозана / И.А. Паламарчук [и др.] // *Химия растительного сырья*. – 2011. – № 2. – С. 57–64.

References

1. Corpas F.J. What is the role of hydrogen peroxide in plant peroxisomes // *Plant Biology*. 2015. vol. 17, no. 6. pp. 1099–1103.
2. Pei J., Wang H., Wu L., Xia S., Xu C., Zheng B., Li T., Jiang Y. Biochemical characterization of a catalase from *Vibrio vulnificus*, a pathogen that causes gastroenteritis // *Acta Biochimica Polonica*. 2017. vol. 64. pp. 1–7.
3. Molnar K., Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: A review // *Z. Naturforsch.* 2010. vol. 65. pp. 157–173.
4. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010. vol. 48. pp. 909–930.
5. Solovev V.B. *Praktikum po jenzimologii: uchebno-metodicheskoe posobie* / V.B. Solovev. Penza, 2007. 52 p.
6. Aebi H. Catalase in vitro // *Methods in enzymology*. 1984. vol. 105. pp. 121–126.
7. Weissman L., Garty J., Hochman A. Characterization of Enzymatic Antioxidants in the Lichen *Ramalina lacera* and Their Response to Rehydration // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. vol. 71, no. 11. pp. 6508–6514.
8. Golubkova N.S. *Opredelitel lishajnikov Rossii. Vypusk 10* / N.S. Golubkova. SPb.: Nauka, 2008. 515 p.
9. Beers R.F., Sizer I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // *Journal of Biological Chemistry*. 1952. vol. 195, no. 1. pp. 133–140.
10. Balasubramanian M., Nirmala P. Evaluation of antioxidant properties of Foliose lichens // *Journal of Chemical and Pharmaceutical research*. 2014. vol. 6, no. 9. pp. 177–184.
11. Maksimov I.V. Vlijanie hitooligosaharidov na sostav izofermentov peroksidazy v sovmestnoj kulture kallusov pshenicy s vozбудителем tverdoj golovni / I.V. Maksimov, E.A. Cherepanova, O.B. Surina // *Fiziologija rastenij*. 2010. T. 57, no. 1. pp. 131–138.
12. Veselova I.A. Povyshenie kataliticheskoy aktivnosti i stabilnosti peroksidazy hrena za schet vkljucheniya ee v polijeletrolitnyj kompleks s hitozanom / I.A. Veselova, A.V. Kirejko, T.N. Shehovcova // *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija*. 2009. T. 45, no. 2. pp. 143–148.
13. Vlijanie ionnoj sily rastvora na process kompleksobrazovanija sulfoproizvodnyh biopolimera lignina i hitozana / I.A. Palamarchuk [i dr.] // *Himija rastitelnogo syrja*. 2011. no. 2. pp. 57–64.