УДК 577.152.1: 582.263

**Н.Д. ТУПИК, Е.К. ЗОЛОТАРЁВА**

Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
01001 Киев, ул. Терещенковская, 2, Украина

# ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР ПЕРОКСИДАЗЫ *CHLOROPHYTA*

Показано, что пероксидаза зеленых водорослей (*Chlorophyta*) представлена множественными молекулярными формами (МФ) как с широкой субстратной специфичностью, так и с четко выраженным сродством только к одному субстрату. У протококковых зеленых водорослей выявлено бóльшее число МФ с широкой субстратной специфичностью, чем у более продвинутых в эволюционном отношении многоклеточных зеленых водорослей. В интегральных спектрах пероксидазы зеленых макрофитов проявляется меньше компонентов с широкой субстратной специфичностью по сравнению с синезелеными водорослями. На примере зеленых водорослей прослеживается сужение субстратной специфичности с усложнением организации организма. Эти данные свидетельствуют об эволюционной значимости МФ ферментов и позволяют рассматривать их как одно из звеньев в биохимических механизмах адаптации.

*Ключевые слова:* зеленые водоросли, пероксидаза, бензидин, пирогаллол, пирокатехин, гваякол, молекулярные формы фермента.

## Введение

Пероксидаза (КФ 1.11.7; оксидоредуктаза) – полифункциональный фермент, широко распространенный в живых организмах и представленный большим количеством изоформ (молекулярных форм, МФ). Пероксидаза (П) играет важную роль в обеспечении клетки энергией, катализируя окисление различных субстратов перекисью водорода. Все МФ пероксидазы строго специфичны в отношении акцептора электронов ($H_2O_2$), тогда как донором электронов в реакции, катализируемой пероксидазой могут быть амины, полифенолы, жирные кислоты, некоторые гетероциклические соединения, в частности индол, аскорбиновая кислота, НАДФ$H_2$ (Ейнор та ін., 1964; Петроченко, Колесников, 1976; Саундерс, 1978, Mehlorn et al., 1996; Overneeu et al., 1998; Shigeoka et al., 2002). Поскольку многие из субстратов, окисляемых П, в высоких концентрациях токсичны для организма, пероксидазный механизм обеспечивает комплексную элиминацию сразу двух групп токсических продуктов – пероксидов и окисляемых субстратов (Гусев, Гохлеренер, 1980).

По-видимому, пероксидаза − один из древнейших белков, и с этим связаны его широкое распространение, полифункциональность, разнообразие и

специфичность молекулярных форм. Повышенный интерес к П в последнее десятилетие способствовал расширению представления о локализации и функциях аскорбатпероксидазы у водорослей (Takeda et al., 1997, 1998; Shigeoka et al., 2002). Синтез некоторых МФ пероксидазы *de novo* индуцируется в результате действия различных экологических факторов, поэтому появление новых молекулярных форм этого фермента рассматривается как маркер стрессового состояния организма.

Цель работы – сравнительное изучение субстратной специфичности молекулярных форм пероксидазы зелёных водорослей в зависимости от их систематической принадлежности.

**Материалы и методы**

Материалом для исследования служили альгологически чистые культуры зелёных водорослей. *Chlorella vulgaris* Bejer, штаммы ПГ и № 19, выращивали на минеральной и органо-минеральной средах (Владимирова, Семененко, 1962), *Ankistrodesmus braunii* Brunnth – на среде Г.М. Паламарь-Мордвинцевой (Паламар-Мордвинцева, 1969). Водоросли выращивали в стерильных условиях в конических колбах, освещая их 8-9 ч в сутки лампами белого света ЛБ-40 (интенсивность освещения 2,5 тыс. лк), при температуре 22-26 $^{o}$C. Суспензию водорослей периодически продували $CO_2$. Водоросли многократно промывали свежеперегнанной дистиллированной водой для удаления взвешенных микроорганизмов. Получаемую биомассу подвергали микробиологическому контролю для учета количества оставшихся прикрепленных бактерий. Использовали метод высева на твердые среды (Родина, 1965). Количество микроорганизмов в собранной биомассе находилось в пределах 0,2-1,3 % сухой биомассы, что исключало погрешность результатов биохимических анализов. Повторность опытов трёхкратная.

Пероксидазную активность определяли после электрофоретического фракционирования белков в полиакриламидном геле (ПААГ), используя в качестве субстрата бензидин, пирогаллол, пирокатехин и гваякол. У красных и синезеленых водорослей количество МФ пероксидазы с различной субстратной специфичностью зависит от систематического положения организма и уменьшается в ходе эволюционного развития таксона (Тупик, Лось, 1978).

В данной работе проведено сравнительное изучение гетерогенности пероксидазы, субстратной специфичности ее МФ у представителей зелёных водорослей в зависимости от их систематической принадлежности. Изучали также зелёные водоросли (макрофиты), собранные на побережье Черного моря в районе г. Севастополя и Кара-Дага в течение трех вегетационных периодов. Были исследованы представители отдела *Chorophyta* из класса *Ulotrichaceae*, порядка *Ulvales*, семейства *Ulvaceae*, рода *Enteromorpha* – *E. intestinalis* (L.) Linn., *E. lactivirens* (Huds.) Kütz., рода *Ulva* Link. – *U. rigida* Ag., порядка *Siphonocladales*, семейства *Cladophoraceae*, рода *Cladophora* Kütz. – *C. albida* (Huds.) Kütz.

Собранные водоросли промывали водой, замораживали в морозильной камере при температуре -4 $^{o}$C и в таком состоянии транспортировали. Количество белка для электрофоретического разделения определяли по методу Лоури (Lowry, 1951). Белок экстрагировали трис-глициновым буфером (pH 8,3) на холоде и с защитными добавками (аскорбиновая кислота и трилон Б). Экстрагировали ферменты методами, которые позволяли последовательно переводить в раствор сначала только растворивые белки (измельченные водоросли экстрагировали в течение 1 ч), а затем белки, связанные со структурными компонентами мембран. Для экстракции связанных белков к экстрагенту (после 5-6-кратной промывки буфером от растворимых белков) добавляли 1 % тритон Х-100 в течение 20 ч. Изозимы П микроводорослей определяли с тритоном, не разделяя их на свободные и структурносвязанные. При сравнительном анализе изозимов зеленых микро- и макрофитов использовали одинаковый способ экстракции белка.

Для характеристики молекулярных форм П применяли метод электрофореза в полиакриламидном геле по схеме, описной ранее (Тупик, Лось, 1978). Для исследования субстратной специфичности фермента использовали метод Мачко и Новацкого (Macko, Novacky, 1966). Контролем служили образцы, которые находились в инкубационной среде без субстрата.

**Результаты и обсуждение**

При сравнительных исследованиях линий, сортов, экотипов и видов для проявления молекулярных форм ферментов используют различные субстраты. Наличие субстратной избирательности свидетельствует о различных свойствах изоферментов и полнее характеризует специфику ферментативных форм исследуемого таксона.

В настоящей работе пероксидазную активность определяли, используя в качестве субстрата бензидин, пирогаллол, пирокатехин и гваякол. Установлена разная способность молекулярных форм к окислению этих соединений.

Молекулярные формы культуры *Ch.vulgaris* шт. № 19 проявляют широкую субстратную специфичность (табл. 1). Выявлены молекулярные формы П с относительной электрофоретической подвижностью (ОЭП) 0,22-0,24; 0,25-0,26; 0,30-0,31; 0,36-0,37; 0,43-0,44, способные к окислению трех субстратов (пирогаллола, пирокатехина и гваякола), и молекулярные формы с ОЭП 0,11-0,13, способные окислять все изученные субстраты. Молекулярные формы П с ОЭП 0,06-0,08 проявляли окислительную активность по отношению к пирогаллолу и пирокатехину. При использовании в качестве субстрата бензидина или гваякола данный изозим не выявлялся. Молекулярная форма с ОЭП 0,50-0,52 окисляла только один субстрат – гваякол.

В спектре изоформ П *Ch. vulgaris* шт. ПГ отмечены незначительные отличия субстратной специфичности МФ по сравнении с МФ П *Ch. vulgaris*

шт. № 19. Способность к окислению бензидина проявили МФ с ОЭП 0,50-0,52 и МФ ОЭП 0,06-0,08, не активные в пероксидазной реакции с этим субстратом у *Ch. vulgaris* шт. № 19.

Каталитическая активность изозимов П *Ankistrodesmus braunii* в реакциях окисления изученных субстратов заметно отличалась от активности молекулярной формы П *Ch. vulgaris*. Так, молекулярная форма с ОЭП 0,40, не проявляющаяся в ЭФ спектрах П *Ch. vulgaris*, катализировала окисление бензидина, пирагаллола и гваякола, а МФ с ОЭП 0,25-0,26 оказалась активна только в реакции окисления пирокатехина. Молекулярная форма с ОЭП 0,16-0,18 катализировала окисление пирогаллола и пирокатехина, а с ОЭП 0,50-0,52 была активна ещё и с гваяколом. Молекулярная форма с ОЭП 0,06-0,08; 0,30-0,31 катализировала окисление бензидина и пирогалолла. Молекулярная форма с ОЭП 0,11-0,13 П *A. braunii* активировала окисление только пирогаллола, также как и П *Ch. vulgaris* шт. ПГ.

Максимальное количество молекулярных форм П у исследованных протококковых водорослей выявлялось при использовании в качестве субстрата пирогаллола (7-8 МФ), меньшее число форм (4-7 МФ) проявлялось при использовании в качестве субстрата пирокатехина и гваякола. Только 2-3 МФ у этих объектов проявили способность катализировать окисление бензидина. Изозимные спектры П различных штаммов были практически одинаковы при использовании всех изученных субстратов в качестве донора электронов. Сравнивая электрофореграммы П протококковых водорослей (см. табл. 1) и макроводорослей (табл. 2), необходимо отметить широкую субстратную специфичность МФ П одноклеточных водорослей.

В табл. 2 приведены данные о субстратной специфичности и количестве молекулярных форм П морских зелёных макроводорослей (порядок *Ulvales – U. rigida, Enteromorpha intestinalis, E. lactivirens*, порядок *Siphonocladales – Cladophora albida*).

У ульвы молекулярные формы с ОЭП 0,16-0,18; 0,22-0,24; 0,60-0,62; 0,82-0,84 проявляются независимо от субстрата, т.е. обладают широкой субстратной специфичностью. В то же время, молекулярные формы П ульвы с ОЭП 0,32-0,34 и 0,68-0,70 активны только в реакции окисления пирокатехина, а с ОЭП 0,42-0,44 – только пирогаллола. П активность видов порядка *Ulvales* (субстрат пирогаллол) проявлялась у 3-5 МФ, являющихся, судя по низкой ЭФ подвижности в геле (см. табл. 2), высокомолекулярными формами фермента. Некоторые из них, например молекулярные формы с ОЭП 0,16-0,18 и 0,22-0,24, проявляли активность во всех изученных образцах водорослей, включая собранные в разные годы, независимо от места произрастания, а следовательно, и от чистоты воды местообитания.

Зоны ОЭП 0,06-0,08 и 0,42-0,44 также характерны для П всех трёх видов порядка *Ulvales*, но их появление зависело от периода сбора. У *U. rigida*, в отличие от двух других исследованных видов этого порядка (*E. intestinalis* и *E. lactivirens*), кроме указанных малоподвижных молекулярных форм П выявлены еще две МФ, способные активно мигрировать в геле в направлении к аноду (ОЭП 0,60-0,62 и 0,82-0,84).

*Таблица 1*. **Изоферментные спектры пероксидазы протококковых водорослей**

| Относительная электрофоретическая подвижность (ОЭП) | *Chlorella vulgaris* Beijer шт. 19 | | | | *Ch. vulgaris* Beijer шт. ПГ | | | | *Ankistrodesmus braunii* Brunnth. | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Бензидин | Пирогаллол | Пирокатехин | Гваякол | Бензидин | Пирогаллол | Пирокатехин | Гваякол | Бензидин | Пирогаллол | Пирокатехин | Гваякол |
| 0,06-0,08 | | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | |
| 0,11-0,13 | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | | | | ■ | | |
| 0,16-0,18 | ■ | ■ | | | | ■ | | | | ■ | ■ | |
| 0,22-0,24 | | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | | ■ | | |
| 0,25-0,26 | | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | | | ■ | |
| 0,30-0,31 | | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| 0,36-0,37 | | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ |
| 0,40-0,42 | | | | | | | | | ■ | ■ | | ■ |
| 0,43-0,44 | | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 0,50-0,52 | | | | ■ | ■ | | | | | ■ | ■ | ■ |

*Таблица 2*. **Изоферментные спектры пероксидазы зеленых макрофитов**

| ОЭП | *Ulva rigida* Ag. | | | *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. | | | *E. lactivirens* (Huds.) Kütz. | | | *Cladophora albida* (Huds.) Kütz. | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Бензидин | Пирогаллол | Пирокатехин | Бензидин | Пирогаллол | Пирокатехин | Бензидин | Пирогаллол | Пирокатехин | Бензидин | Пирогаллол | Пирокатехин |
| 0,06-0,08 | ■ | | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 0,16-0,18 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | | ■ | |
| 0,22-0,24 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 0,32-0,34 | | | ■ | ■ | | | | | | | | ■ |
| 0,42-0,44 | | ■ | | | | ■ | | ■ | ■ | ■ | | |
| 0,60-0,62 | ■ | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | |
| 0,68-0,70 | | | ■ | | | | | | | | | |
| 0,82-0,84 | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | |

Независимо от сроков отбора проб и места произрастания *C. albida*, обнаружены молекулярные формы П с ОЭП 0,06-0,08; 0,16-0,18 и 0,22-0,24, характерные также для *U. rigida*.

В целом П видов рода *Ulva* отличаются от П видов рода *Cladophora* наличием более подвижных МФ (0,68-0,70 и 0,82-0,84).

При использовании бензидина в качестве субстрата изозимные спектры П изученных зелёных макрофитов весьма похожи на спектры, полученные при окислении пирогаллола. Обнаружены и характерные молекулярные формы П. Так, узкую субстратную специфичность в отношении бензидина имеет молекулярная форма П с ОЭП 0,42-0,44 у *Cl. albida* и 0,32-0,34 – у *E. intestinalis*.

Использование в качестве субстрата пирокатехина позволило выявить у морских зелёных водорослей от 4 до 7 изоформ П в основном малой и средней подвижности. Такое же количество молекулярных форм П (4-7) обнаружено при окислении пирокатехина у всех изученных видов водорослей (и одноклеточных, и многоклеточных), т.е. эту активность П нельзя связывать с видовой принадлежностью организма.

Обнаружены зоны П активности, постоянно встречающиеся в изоэнзимных спектрах П всех исследованных водорослей (молекулярная форма с ОЭП 0,06-0,08 и 0,22-0,24), малоизменчивые (с ОЭП 0,42-0,44) и изменчивые (с ОЭП 0,16-0,18 и 0,60-0,62).

Для зелёных, как и для других отделов водорослей, характерна разная локализация фермента. П существует в растворимом состоянии и в состоянии разной прочности связывания с компонентами мембран. Этот вывод основывается на экспериментах (табл. 3) по последовательному экстрагированию П разными способами, в результате чего сначала в раствор переходят только растворимые белки, а затем белки, погруженные в мембрану.

Последовательное фракционирование фермента позволило обнаружить интересные закономерности. Оказывается, одну и ту же форму П можно обнаружить среди растворимых и структурно связанных белков. Иногда конкретная МФ проявляется только в одном из состояний – растворимом или связанном (см. табл. 3). Например, у исследованных макрофитов, независимо от того, когда и где были собраны водоросли (см. Материалы и методы), молекулярные формы П с ОЭП 0,06-0,08 и 0,22-0,24 активны в реакции окисления пирокатехина как в растворимом, так и в структурносвязанном состоянии. Молекулярные формы с большой ЭФ подвижностью (ОЭП 0,68-0,70 и 0,82-0,84) характерны для растворимого и мембраносвязанного состояния П *U. rigida*.

В большинстве случаев растворимая и структурносвязанная формы П с одинаковой субстратной специфичностью имели одинаковую ЭФ подвижность. В начале вегетационного периода пероксидазные зоны в зимограммах П морских зеленых водорослей представлены функционально более активными рабствоpимыми формами, тогда как в конце лета превалировали структурно-связанные формы фермента. Такая же зависимость отмечена при изучении изоферментного состава П других отделов водорослей (Судьїна та ін., 2007).

*Таблица 3*. **Изоферментные спектры пероксидазы зеленых микро и макрорфитов**

| ОЭП | Бензидин | | | | | | | | | | | | Пирогаллол | | | | | | | | Пирокатехин | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Ulva rigida* Ag. | | *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. | | *E. lactivirens* (Huds.) Kütz. | | *Cladophora albida* (Huds.) Kütz. | | *C. liniphormis* Kütz. | | *Bryopsis plumosa* (Huds.) Ag. | | *Ulva rigida* | | *Enteromorpha intestinalis* | | *E. lactivirens.* | | *Cladophora albida* | | *Ulva rigida* | | *Enteromorpha intestinalis* | | *E. lactivirens* | | *Cladophora albida* | |
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 0,06-0,08 | ■ | | | | ■ | | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 0,16-0,18 | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | | ■ | ■ | | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | ■ | | | |
| 0,22-0,24 | ■ | ■ | | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| 0,32-0,34 | | | | ■ | | | | | | | ■ | ■ | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | ■ | |
| 0,40-0,42 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | | ■ | ■ | |
| 0,43-0,44 | | | ■ | | | | ■ | ■ | | | | | ■ | ■ | | | | ■ | | | | | | | | | | |
| 0,60-0,62 | ■ | ■ | ■ | | ■ | | ■ | | | | | | ■ | ■ | | | | | | | ■ | | | | ■ | ■ | | |
| 0,68-0,70 | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| 0,82-0,84 | ■ | ■ | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | ■ | ■ | | | | | | |

П р и м е ч а н и е : 1, 2 – соответственно растворимые и структурносвязанные формы фермента.

*Таблица 4*. **Изоферментные спектры пероскидазы зеленых морских водорослей**

| ОЭП | Бензидин | | | | | | | Пирогаллол | | | | | | Пирокатехин | | | | | | Гваякол | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Chlorella vulgaris* Beijer | | *Ankistrodesmus braunii* (Brunnth) | *Ulva rigida* Ag. | *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. | *E. lactivirens* (Huds.) Kütz. | *Cladophora albida* (Huds.) Kütz. | *Chlorella vulgaris* | | *Ankistrodesmus braunii* | *Ulva rigida* | *Enteromorpha intestinalis* | *E. lactivirens.* | *Cladophora albida* | *Chlorella vulgaris* | | *Ankistrodesmus braunii* | *Ulva rigida* | *Enteromorpha intestinalis* | *E. lactivirens* | *Cladophora albida* | *Chlorella vulgaris* | *Ankistrodesmus braunii* |
| | шт.19 | шт.ПГ | | | | | | шт.19 | шт.ПГ | | | | | | шт.19 | шт.ПГ | | | | | | шт.19 | шт.ПГ | |
| 0,06-0,08 | | | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | |
| 0,11-0,13 | ■ | | | | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | ■ | | | | | | | ■ | | |
| 0,16-0,18 | ■ | | | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | | ■ | | | | |
| 0,22-0,24 | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 0,30-0,31 | | | ■ | | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ |
| 0,32-0,34 | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | |
| 0,36-0,37 | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | | | |
| 0,40-0,42 | | | ■ | | ■ | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ |
| 0,43-0,44 | | | | | | | ■ | ■ | ■ | | ■ | | ■ | | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| 0,50-0,52 | | ■ | | | | | | | | ■ | | | | | | | ■ | | | | | ■ | | ■ |
| 0,60-0,62 | | | | ■ | | ■ | ■ | | | | ■ | | | | | | | ■ | | ■ | | | | |
| 0,68-0,70 | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | |
| 0,82-0,84 | | | | ■ | | | | | | | ■ | | | | | | | ■ | | | | | | |

В гомогенате макрофитовых форм зеленых водорослей выявляется меньшее количество молекулярных форм П, чем в экстрактах микрофитов. Так, при использовании в качестве субстрата пирогаллола количество компонентов в вероятностных спектрах П протококковых водорослей варьировало от 7 до 8, а у морских макрофитов – от 3 до 5. Определенный интерес представляет сравнение субстратспецифических П разных водорослей (табл. 4). У всех исследованных видов субстратную специфичность к пирогаллолу проявляют молекулярные формы П с ОЭП 0,16-0,18; 0,22-0,24 и у шести из семи исследованных видов (ОЭП 0,06-0,08); у четырех видов – к бензидину (ОЭП 0,16-0,18).

В то же время, определены молекулярные формы, способные участвовать в окислении только данного субстрата у одного объекта (см. табл. 4). Следовательно, у зелёных водорослей (как и у изученных нами ранее синезелёных, бурых и красных водорослей) установлены молекулярные формы П с узкой и широкой специфичностью. Среди зелёных водорослей максимальное количество МФ, а также форм с широкой субстратной специфичностью имеют протококковые водоросли (7-8), в отличие от более продвинутых многоклеточных водорослей (3-5 МФ).

В интегральных спектрах П зеленых макрофитов (как и изученных ранее красных и бурых водорослей) проявляется меньше компонентов с широкой субстратной специфичностью по сравнению с синезелеными водорослями (Тупик, Вознесенська, 1987, Тупик, Золотарьова, 2006).

**Заключение**

Ранее при изучении синезеленых водорослей (Тупик, Лось, 1978) были также обнаружены множественные формы П с разной субстратной специфичностью. Причем большее количество (5-10) МФ с широкой субстратной специфичностью найдено у хроококковых водорослей по сравнению с гормогониевыми (1-3). Эта особенность П синезеленых водорослей, вероятно, связана с легкой приспосабливаемостью этих видов к условиям произрастания и с древностью их происхождения.

Результаты данной работы свидетельствуют о том, что с усложнением организации зеленых водорослей субстратная специфичность их П сужается. Формирование набора молекулярных форм П с разным сродством к субстратам можно рассматривать как генетически детерминированную реакцию организма на изменяющиеся условия существования. Данные исследований свидетельствуют об эволюционной значимости МФ ферментов и позволяют считать их важным звеном в механизмах адаптации водорослей.

**Благодарности**

Выражаем искреннюю благодарность сотрудникам отдела фитобентоса и культивирорвания водорослей ИнБЮМ НАН Украины за содействие при определении видового состава водорослей.

*N.D. Tupik, E.K. Zolotareva*

N.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Tereshchenkovskayavska Str., 01001 Kiev, Ukraine

ISOENSYME SPECTRUM OF CHLOROPHYTA PEROXIDASE

The aim of the work was a comparative study of substrate specificity of molecular forms (MF) of green alga peroxidase depending on their systematic position, ecological conditions, of place and period of vegetation. Peroxidase activity was determined after the electrophoretic separation of proteins in PAAG, using benzidine, pyrogallol, pyrocatechol and guaiacol as substrata. Plural MFs of peroxidase both with wide substrate specificity and with expressed affinity only to one substrata were found in green alga. The greater number of MFs with wide substrate specificity was detected in unicellular green alga than it was found in more evolutional advanced multicellular green alga. The number of MFs of peroxidase in the integral spectra of green macrophytes, as well as early studied red and brown alga, was lesser than in blue-green alga. It was concluded that substrate specificity of peroxidase in green alga as well as in blue-green and red alga is narrowed with complication of their organization. The data are evidenced of evolutional importance of enzymatic MFs diversity and allow to consider them as one of units in the biochemical mechanisms of adaptation.

*K e y w o r d s* : green alga, peroxidase, benzidine, pyrogallol, pyrocatechol, guaiacol, molecular forms.

*Владимирова М.Г., Семененко В.Е.* Интенсивная культура одноклеточных водорослей. – М.: Изд-во АН СССР, 1962. – 58 с.

*Гусев М.В., Гохлернер Г.Б.* Свободный кислород и эволюция клетки. – М.: Изд-во МГУ, 1980. – 320 с.

*Ейнор Л.О., Тупик Н.Д., Колесников П.О.* Пероксидаза хлорелли // Доп. АН УРСР. – 1964. – **2**. – С. 238-241.

*Паламар-Мордвинцева Г.М.* Потреба анкістродесма Брауна (*Ankistrodesmus braunii* Brunth) у залізі // Укр. бот. журн. – 1969. – **25**, № 1. – С. 21-28.

*Петроченко Е.И., Колесников П.А.* Окисление $НАДН_2$ субклеточными фракциями с участием пероксидазы и молекулярного кислорода // Биохимия. – 1976. – **31**, вып. 6. – С. 1117-1120.

*Родина А.Г.* Методы водной микробиологии. – М.: Наука, 1965. – 362 с.

*Саундерс Б.К.* Пероксидазы и каталазы // Неорганическая биохимия. – М.: Мир, 1978. – С. 434-470.

*Судьїна О.Г., Шнюкова Є.І., Мушак П.О. та ін.* Біохімія червоних водоростей. – К., 2007. – 320 с.

*Тупик Н.Д., Золотарьова О.К.* Субстратна специфічність пероксидази різних відділів водоростей // Мат. XII з'їзду Укр. бот. тов-ва. – Одеса, 2006. – С. 506.

*Тупик Н.Д., Вознесенська А.В.* Особливості пероксидази різних відділів водоростей // V Укр. біохім. з'їзд. – К., 1987. – Ч. 2. – С. 270.

*Тупик Н.Д., Вознесенська А.В.* Множинні МФ дегідрогеназ зелених водоростей // Укр. бот. журн. – 1989. – **46**, № 5. – С. 72-76.

*Тупик Н.Д., Лось С.І.* Ізоферменти пероксидази синьозелених водоростей // Там же. – 1978. – **35**, № 2. – С. 158-165.

*Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randale R.I.* Protein mesurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – N 193. – P. 265-275.

*Macko V., Novacky A.* Contribution to the study of plant peroxidase isozymes by means of disk electrophoresis on acrylamyde gel // Biologia. – 1966. – **21**, N 2. – P. 128-132.

*Mehlhorn H., Lelandias M., Korth H.G., Fayer C.H.* Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases // FEBS Lett. – 1996. – **378**, N 3. – P. 2034-2036.

*Overney S., Togniolli M., Simon P., Greppin H., Penel C.* Peroxidases and hydrogen peroxidase: Where, when, why? // Dull. Soc. Roy. Sci. Liege. – 1998. – **67**, N 3/4. – P. 89-98.

*Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M.* Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes // J. Exp. Bot. – 2002. – **53**, N 372. – P. 1305-1319.

*Takeda T., Ishikawa T., Shigeoka S.* Metabolism of hydrogen peroxidase by the scavenging system in *Chlamydomonas reinhardtii* // Physiol. Plant. – 1997. – **99**. – P. 49-55.

*Takeda T., Yoshimura K., Ishikawa T., Shigeoka S.* Puriphication and characterization of ascorbate peroxidase in *Chlorella vulgaris* // Biochimie. – 1998. – **80**. – P. 295-301.

Получена 26.06.07

Подписала в печать Л.И. Мусатенко