

## ДИНАМИКА КОМПОНЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЛОДОВ *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. В ПРОЦЕССЕ СОЗРЕВАНИЯ

А.М. Деева

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь  
e-mail: allamakarevich@rambler.ru

### Введение

В процессе метаболизма образуются соединения кислорода, которые разрушают структуру и вещества клетки. В результате эволюции у аэробов возникли защитные механизмы, к которым относятся специализированные ферментные и неферментные антиоксидантные системы, которые содержат разные низко- и высокомолекулярные соединения. К высокомолекулярным антиоксидантам относят мембраносвязанные и цитозольные ферменты (каталаза, пероксидазы, супероксиддисмутаза и трансферазы). Низкомолекулярные антиоксиданты разделяют на жирорастворимые (токоферолы, каротиноиды, убихинон) и водорастворимые (фенольные соединения, в частности антоцианы, аскорбиновая кислота, хлорофилл А и В). [1].

Активация процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран, вызванная усиленной генерацией активных форм кислорода (АФК), является одним из первых процессов, происходящих у растений при воздействии различных стрессовых факторов [2]. Повышение уровня ПОЛ может привести к серьезным повреждениям мембран и вызывает существенные нарушения их структуры и функций [3]. Начальный этап в повышении ПОЛ – интенсификация генерации АФК [4]. В клетках растений образование АФК наиболее интенсивно идет в хлоропластах [5]. Этим объясняется высокая степень выраженности в данных органеллах изменений в состоянии про- и антиоксидантного равновесия в клетках при различных воздействиях извне.

В стрессовых условиях для контролирования окислительных процессов необходима быстрая адаптация растения к условиям окружающей среды. Известно, что активность антиоксидантной системы растения может повышаться при воздействии стрессов различной природы [4]. Уровень адаптации растений в значительной степени определяется соотношением уровня ПОЛ и активности антиоксидантной системы.

Для оценки изменения активности антиоксидантной системы плодов голубики в течение вегетационного периода мы измеряли количественное содержание низкомолекулярных антиоксидантов, а также величины активности одних из основных ферментов антиоксидантной защиты каталазы, пероксидазы, показатели перекисного числа и перекисного окисления липидов в зеленых и спелых плодах 14 сортов *Vaccinium corymbosum* L. (голубика высокая) Bluecrop, Bluejay, Bluerose, CarolinaBlue, Darrow, Duke, Elisabeth, HardyBlue, Herbert, Jersey, Nelson, Northblue, Northland, Patriot и *Vaccinium uliginosum* L. (голубика топяная).

### Методы исследования

Образцы сортов *V. corymbosum* и плоды *V. uliginosum* были собраны в южной агроклиматической зоне республики на Ганцевичской научно-экспериментальной базе «Журавинка» ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси». Собранные плоды замораживались при температуре -20°C. Для проведения анализа отбирались 150–200 г плодов голубики каждого таксона, которые затем гомогенизировались. Для проведения экстракции отбиралась навеска около 3–5 г.

Количественное определение суммарного содержания антоциановых пигментов было проведено методом рН-дифференциальной спектрофотометрии [6, 7] на спектрофотометре Agilent 8453 при 510 нм и 700 нм. Результаты были выражены как миллиграмм-эквивалент цианидин-3-глюкозида в 100 г сухой массы плодов. Содержание каротиноидов и хлорофилла определяли спектрофотометрическим методом, экстрагируя пробы ацетоном [8]. Количественное содержание аскорбиновой кислоты в плодах *V. corymbosum* было определено титриметрическим методом [8]. Антиоксидантные свойства голубики оценивались в системе с катион-радикалами АБТС+• [9] и свободными радикалами ДФПГ• [10].

Определение перекисного числа (ПЧ) проводилось по методу [11], основанному на реакции выделения йода перекисями из йодистого калия в кислой среде с последующим титрованием выделившегося йода тиосульфатом натрия. Содержание белка в образцах –

методом Bredford [12]. Определение активности пероксидаз в образцах проводилось по Бояркину [13], используя в качестве хромогенного субстрата бензидин. Каталазную активность в образцах определяли по модифицированному методу на основе методов Chance, Maehly [14] и Aebi [15]. Субстратом фермента служила  $H_2O_2$ , приготовленная на 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,0) по прописи из каталога фирмы «Sigma» [16]. Оптическая плотность раствора  $H_2O_2$  при 240 нм должна была равна 0,550–0,520 против 50 мМ фосфатного буфера, рН 7,0.

### Результаты и обсуждение

В результате полученных данных было установлено, что содержание всех исследуемых биологически активных соединений в процессе созревания повышалось, однако это происходило с различной степенью интенсивности. Содержание суммы фенольных соединений в изученных сортах голубики повысилось в 1,2–2,8 раза, в их составе содержание антоциановых пигментов увеличилось в 100–9000 раз, количество витамина С в процессе созревания в 1,0–1,8 раз повысилось.

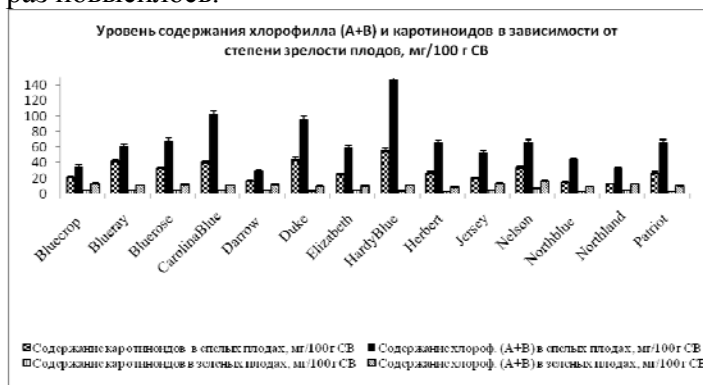


Рисунок 1 – Содержание пластидных пигментов в зеленых и спелых плодах *V. corymbosum*

По результатам эксперимента содержание каротиноидов в зеленых плодах *V. corymbosum* колебалось в пределах от  $2,74 \pm 0,15$  мг/100 г для сорта Northblue до  $6,44 \pm 0,27$  мг/100 г для сорта Nelson, а в спелых – от  $12,93 \pm 0,18$  мг/100 г для сорта Northland до  $56,14 \pm 1,66$  мг/100 г для сорта HardyBlue.

Была найдена корреляционная связь между показателями антиоксидантной активности (АОА) в модельных системах с АБТС+• катион-радикалами, свободными радикалами ДФПГ• и содержанием фенольных соединений в зеленых ягодах (коэффициенты корреляции составили 0,55 (после 1 мин) и 0,78 (после 10 мин) соответственно для АБТС+• и ДФПГ• (таблица 1).

Таблица 1 – Коэффициенты корреляции зеленые и спелые (справа) ягоды

	Сод. антоц., мг/100г сух. в-а (СВ)	Сод. фенол. соед., мг/100 г СВ	АБТС+• АОА, 1 мин	АБТС+• АОА, 6 мин	ДФПГ• АОА, 10 мин	ДФПГ• АОА, 30 мин	Сод. вит. С мг/100 г СВ	Сод. каротиноидов, мг/100 г СВ	Сод. хл. А, мг/100 г СВ	Сод. хл. В, мг/100 г СВ	Хл. (А+В), мг/100 г СВ	Сод. МДА, мМ/100 г СВ
Содерж. антоц., мг/100 г СВ		<b>0,694</b>	<b>0,821</b>	<b>0,805</b>	<b>0,871</b>	<b>0,871</b>	<b>0,933</b>	0,331	0,363	0,252	0,307	<b>-0,930</b>
Содерж. фенол. соед., мг/100 г СВ	0,368		<b>0,661</b>	<b>0,636</b>	<b>0,806</b>	<b>0,796</b>	<b>0,656</b>	0,370	0,087	0,322	0,247	<b>-0,646</b>
АБТС+• АОА, мкмоль тролокса /г СВ 1 мин	0,013	<b>0,554</b>			<b>0,804</b>	<b>0,793</b>	<b>0,797</b>	<b>0,576</b>	0,376	<b>0,525</b>	0,481	<b>-0,860</b>
АБТС+• АОА, мкмоль тролокса /г СВ 6 мин	-0,008	0,422			<b>0,780</b>	<b>0,769</b>	<b>0,775</b>	<b>0,560</b>	0,378	<b>0,519</b>	0,477	<b>-0,844</b>
ДФПГ• АОА, мкмоль тролокса /г СВ 10 мин	<b>0,568</b>	<b>0,782</b>	<b>0,555</b>	<b>0,555</b>			<b>0,773</b>	0,383	0,282	0,462	0,406	<b>-0,864</b>
ДФПГ• АОА, мкмоль тролокса /г СВ 30 мин	0,471	<b>0,704</b>	<b>0,556</b>	<b>0,556</b>			<b>0,757</b>	0,328	0,217	0,394	0,339	<b>-0,852</b>
Содерж. вит. С мг/100 г СВ	0,183	<b>0,851</b>	<b>0,772</b>	<b>0,632</b>	<b>0,720</b>	<b>0,663</b>		0,420	0,228	0,410	0,353	<b>-0,929</b>
Содерж. каротиноидов, мг/100 г СВ	-0,410	0,113	0,461	0,434	-0,121	-0,207	0,444		<b>0,778</b>	<b>0,860</b>	<b>0,841</b>	<b>-0,518</b>
Содерж. хлороф. А, мг/100 г СВ	-0,369	0,124	0,446	0,447	-0,107	-0,161	0,345	<b>0,907</b>		<b>0,956</b>	<b>0,980</b>	-0,409
Содерж. хлороф. В, мг/100 г СВ	-0,310	0,009	0,102	0,042	<b>-0,513</b>	<b>-0,528</b>	0,084	0,428	0,389		<b>0,995</b>	<b>-0,551</b>
Хлороф. (А+В), мг/100 г СВ	-0,410	0,100	0,386	0,363	-0,287	-0,336	0,301	<b>0,873</b>	<b>0,930</b>	<b>0,700</b>		<b>-0,509</b>
Содерж. МДА, мМ/100 г СВ	<b>0,632</b>	-0,010	-0,369	-0,302	0,105	0,096	-0,347	<b>-0,549</b>	-0,352	-0,210	-0,356	

Коэффициенты корреляции составили 0,76 (после 1 мин) и 0,72 (после 10 мин) соответственно для АБТС+• иДФПГ• между значениями АОА и содержанием аскорбиновой кислоты в зеленых плодах. Для спелых плодов корреляционные связи были найдены между показателями АОА и содержанием антоциановых пигментов, фенольных соединений, витамина С, каротиноидов и хлорофилла В. Коэффициенты корреляции являлись значимыми на основании того, что расчетные значения критерия Стьюдента во всех корреляционных полях превышали табличные (количество степеней свободы 12 и уровень значимости  $p < 0,05$ ) (таблица 1).

Для оценки изменения активности антиоксидантной системы плодов голубики в течение вегетационного периода измерялись величины активности одних из основных ферментов антиоксидантной защиты каталазы и пероксидазы, содержание малонового диальдегида и  $H_2O_2$  в зеленых и спелых плодах голубики высокой (таблицы 2, 3).

Таблица 2 – Содержание малонового диальдегида, и активность каталазы в зеленых и спелых плодах

Таксон	Активность КАТ, 1М $H_2O_2$ /(мг белка•мин) (зеленые плоды)	Ср. знач. конц. МДА, мМ/100 г сух. веса (зеленые плоды)	Активность КАТ, 1М $H_2O_2$ /(мг белка•мин)	Ср. знач. конц. МДА, мМ/100 г сух. веса
Bluecrop	0,295	0,152	0,115	0,634
Blueray	0,129	0,167	0,099	0,242
Bluerose	0,298	0,030	0,069	0,219
CarolinaBlue	1,079	0,014	0,296	0,132
Darrow	0,936	0,012	0,166	0,493
Duke	2,410	0,045	0,139	0,562
Elizabeth	1,862	0,040	0,148	0,578
HardyBlue	1,048	0,026	0,085	0,248
Herbert	1,149	0,014	0,040	0,140
Jersey	1,262	0,003	0,159	0,340
Nelson	1,822	0,003	0,321	0,268
Northland	0,491	0,041	0,111	0,711
Patriot	0,448	0,126	0,231	0,374
<i>V. uliginosum</i>	–	–	0,586	–

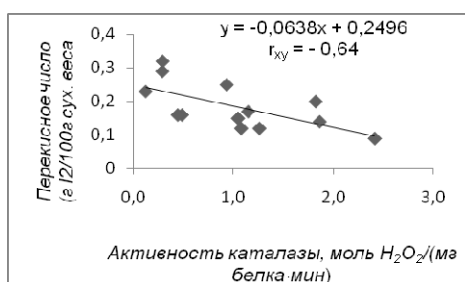
Примечание: ошибка среднего не превышала 5%.

Таблица 3 – Количество  $H_2O_2$  в зеленых и спелых плодах голубики

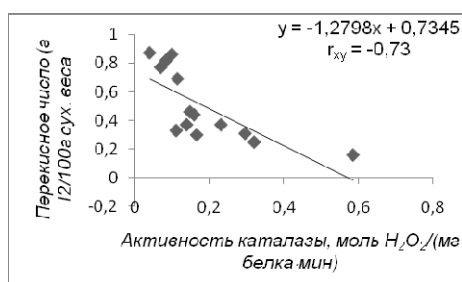
Таксон	ПЧ (г I <sub>2</sub> /100г СВ)	Таксон	ПЧ (г I <sub>2</sub> /100г СВ)
Bluecrop зелен. ягоды	0,19±0,01	Bluecrop	0,59±0,03
Blueray зелен. ягоды	0,23±0,02	Blueray	0,6±0,04
Bluerose зелен. ягоды	0,27±0,02	Bluerose	0,47±0,01
CarolinaBlue зелен. ягоды	0,18±0,01	CarolinaBlue	0,31±0,02
Darrow зелен. ягоды	0,21±0,01	Darrow	0,3±0,01
Duke зелен. ягоды	0,2±0,01	Duke	0,37±0,01
Elizabeth зелен. ягоды	0,14±0,01	Elizabeth	0,46±0,02
HardyBlue зелен. ягоды	0,17±0,01	HardyBlue	0,47±0,03
Herbert зелен. ягоды	0,17±0,00	Herbert	0,55±0,03
Jersey зелен. ягоды	0,2±0,01	Jersey	0,44±0,02
Nelson зелен. ягоды	0,2±0,01	Nelson	0,45±0,03
Northblue зелен. ягоды	0,15±0,00	Northblue	0,34±0,00
Northland зелен. ягоды	0,16±0,01	Northland	0,33±0,00
Patriot зелен. ягоды	0,16±0,01	Patriot	0,27±0,02
	–	<i>V. uliginosum</i>	0,46±0,01

Из анализа полученных результатов видно, что активность каталазы в зеленых плодах колеблется в пределах от 0,129 моль  $H_2O_2$ /(мг белка мин) до 2,417 моль  $H_2O_2$ /(мг белка мин), тогда как в спелых плодах снижается, находясь в диапазоне от 0,040 моль  $H_2O_2$ /(мг белка мин) до 0,672 моль  $H_2O_2$ /(мг белка мин). Активность каталазы в зеленых плодах выше в среднем в 1,17–17,4 раз, а для сорта Herbert в 28,96 раз. Степень увеличения перекисного числа в процессе созревания плодов голубики колебалась в пределах 1,2–5,5, активность пероксидазы в зеленых плодах выше, чем в созревших в среднем в 1,5–3,5 раза. Для анализа значимости различий в показателях между зелеными и созревшими ягодами использовались методы статистической проверки t-критерий Стьюдента. Коэффициент корреляции между показателями активность каталазы – содержание МДА в зеленых плодах равен – 0,564, данный показатель для спелых ягод являлся незначимым. Коэффициент корреляции между

показателями активность каталазы – перекисное число, активность пероксидазы – перекисное число в зеленых плодах был ниже – 0,6, что свидетельствует об обратной корреляционной зависимости данных показателей. На рисунках 2, 3 представлены корреляционные зависимости между уровнем активности каталазы и количеством  $H_2O_2$  (г  $I_2/100$  г СВ) для разных степеней зрелости плодов.



а



б

Рисунок 2 – корреляционная связь между активностью каталазы, моль  $H_2O_2$ /(мг белка в мин) и уровнем перекисного числа, г  $I_2/100$  г СВ для зеленых (а) и спелых (б) плодов голубики

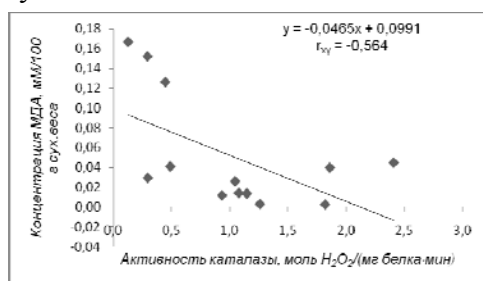


Рисунок 3 – Корреляционная связь между активностью каталазы, моль  $H_2O_2$ /(мг белка в мин) и уровнем перекисного окисления липидов, ммоль МДА/100 г СВ зеленых плодов голубики

Как известно [17–27], высокий уровень формирования первичных и вторичных продуктов ПОЛ сопровождается компенсаторной активацией антиоксидантной системы, о чем свидетельствовало повышение показателей активности ферментов в зеленых плодах. Созревание плодов, сопровождавшееся значительным увеличением количества антоцианов, приводило к уменьшению активности антиоксидантных ферментов, что может косвенно свидетельствовать о роли антоцианов в системе антиоксидантной защиты растения.

При этом наблюдаемое постоянство в уровне содержания малонового диальдегида в плодах при их формировании и созревании свидетельствует о поддержании постоянства в функционировании антиоксидантной системы за счет попеременного действия как высокомолекулярных так и низкомолекулярных антиоксидантов: уменьшения активности ферментной защиты при повышении содержания основных низкомолекулярных антиоксидантов, таких как антоцианы в процессе созревания. Таким образом, показана роль антоцианов как высокоэффективных сквенджеров радикалов и их участие в антиоксидантной системе плодов голубики высокой и топяной.

### Выводы

Установлена корреляционная связь между показателями АОА в модельных системах с АБТС+• катион-радикалами, свободными радикалами ДФПГ• и содержанием фенольных соединений в зеленых ягодах. Для спелых плодов корреляционные связи были найдены между показателями АОА и содержанием фенольных соединений и антоциановых пигментов, витамина С, каротиноидов, хлорофилла В.

В процессе созревания параметр антиоксидантной активности в системе с АБТС+• повышается в среднем в 1,4–4,7 раза, системе с ДФПГ• – в 1,6–5,3 раз. Т.к. коэффициенты корреляции более 0,7 наблюдаются только между показателями АОА – антоцианы, АОА – витамин С, а также в процессе созревания накопление антоцианов в плодах голубики максимально, то накопление водорастворимых антоциановых пигментов в спелых плодах *V. corymbosum* в первую очередь обуславливает повышение АОА.

Следовательно, роль антоцианов как участников антиоксидантной системы в процессе созревания повышается, что на фоне снижения активности антиоксидантных ферментов, позволяет поддерживать стабильность развития.

**Список литературы**

1. Меньщикова, Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113. – № 4. – С. 442–455.
2. Bohnert, H.J. Plant stress adaptations – making metabolism move / H.J. Bohnert // Current Opinion in Plant Biology. – 1998. – Vol. 1, № 3. – P. 267–274.
3. Перекисное окисление и стресс / В.А. Барабой [и др.] – СПб.: Наука, 1992. – 148 с.
4. Действие засоления на антиокислительные защитные системы, перекисное окисление липидов и содержание хлорофилла в листьях фасоли / Ф. Ясар [и др.] // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 6.
5. Мерзляк, М.Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений / М.Н. Мерзляк // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 9. – С. 20–26.
6. Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in the Northwest Croatia. / V. Dragovic-Uzelac [et al.] // Food Technology and Biotechnology. – 2010. – Vol. 48, № 2. – P. 214–221.
7. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juice / L. Jakobek [et al.] // Deutsche Lebensmittel-Rundschau. – 2007. – Vol. 103, № 2. – P. 58–64.
8. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков [и др.] // Определение витаминов и других биологически активных веществ. – Агропромиздат, 1987. – Гл. 4. – С. 85–122.
9. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. / R. Re [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – Vol. 26, №9/10. – P. 1231–1237.
10. Antioxidant activity of betalains from plants of the *Amaranthaceae*. / Cai Yizhong [et al.] // Journal of agricultural and food chemistry. – 2003. – Vol. 51. – P. 2288–2294.
11. Шапиро, Д.К. Практикум по биологической химии / Д.К. Шапиро; под ред. А.С. Вечера. – Минск: Высшая школа, 1976. – С. 169–170.
12. Bredford, M.M. A rapid sensitive method for the action of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding / M.M. Bredford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
13. Хавкин, Э.Е. Наследуемые изменения в спектрах пероксидазы эстераз у соматоклонов кукурузы / Э.Е. Хавкин, М.В. Забродина // Физиология растений. – 1994. – Т. 41, вып. 6. – С. 859–867.
14. Chance, B. Assay of catalases and peroxidases / B. Chance, A.C. Maehly // Methods in Enzymology. – 1955. – Vol. 2. – P. 764–773.
15. Aebi, H.E. Catalase // Methods in Enzymatic Analyses / Ed. Bergmeyer H.U. – 1955. – Vol. 2. – P. 764–773.
16. Реактивы для биохимии и исследований в области естественных наук: каталог фирмы «Sigma» (США). – 1999. – С. 229.
17. Чиркова, Т.В. Физиологические основы устойчивости растений / Т.В. Чиркова. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2002. – 244 с.
18. Чупахина, Г.Н. Природные антиоксиданты (экологический аспект) / Г.Н. Чупахина, П.В. Масленников, Л.Н. Скрыпник. – Калининград: Балтийский федеральный университета им. И. Канта, 2011. – 111 с.
19. Полесская, О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода / О.Г. Полесская. – М.: КДУ, 2007. – 140 с.
20. Особенности окислительного стресса растений табака, трансформированных геном desCD9-ацил-липидной десатуразы из *Synechococcus vulcanus*, при гипотермии / В.Н. Попов [и др.] // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 4. – С. 525–529.
21. Влияние сахаров на развитие окислительного стресса, вызванного гипотермией (на примере растений картофеля экспрессирующих ген инвертазы дрожжей) / А.Н. Дерябин [и др.] // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 1. – С. 39–46.
22. Oxidative stress and antioxidative system in plants / A. Arora [et al.] // Current science. – 2002. – Vol. 82, № 10. – P. 1227–1238.
23. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance / R. Mittler // Trends in Plant Science. – 2002. – Vol. 7, № 9. – P. 405–410.
24. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants / Y. Kovtun [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. – 2000. – Vol. 97, № 6. – P. 2940–2945.
25. Polle, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in Chloroplasts by metabolic modeling. computer simulations as a step towards flux analysis / A. Polle // Plant Physiology. – 2001. – Vol. 126, № 1. – P. 445–462.
26. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М.В. Кения [и др.] // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, № 4. – С. 456–470.
27. Siess, H. Antioxidant functions of vitamins – vitamin E and vitamin C,  $\beta$ -Carotene, and other carotenoids and intercellular communication via Gap Junctions / H. Siess, W. Stahl // Int. J. Vitam. Nutr. Res. – 1997. – Vol. 67. – P. 364 – 367.