

ДЕЙСТВИЕ СВЕТА НА АКТИВНОСТЬ ФЕНИЛАЛАНИНАММИАКЛИАЗЫ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ *ESCHINACEA PURPUREA*

Дитченко Т.И., Митус А.А.

Белорусский государственный университет, Минск,
Беларусь, ditchenko@inbox.ru

Фенилаланинаммиаклиаза (ФАЛ Е.С. 4.3.1.5) является ключевым ферментом фенилпропаноидного метаболизма растений. ФАЛ катализирует реакцию дезаминирования L-фенилаланина с образованием транскоричной кислоты, которая подвергается пара-гидроксилированию с образованием *n*-гидроксикоричной (*n*-кумаровой) кислоты. После дополнительного гидроксилирования и последующего метилирования из нее образуются остальные гидроксикоричные кислоты (ГКК): кофейная, феруловая, синаповая.

ГКК представляют центральное звено синтеза всех фенольных соединений (ФС) растительной клетки. Орто-кумаровая кислота является предшественником кумаринов. После ряда реакций укорочения алифатической части ее молекулы образуются оксибензойные кислоты. ГКК могут образовывать различные конъюгаты, прежде всего с сахарами, однако основная масса ГКК активируется путем взаимодействия с СоА. Два магистральных пути использования СоА-эфиров ГКК – синтез лигнинов и синтез флавоноидов. Таким образом, фенилаланин – основной предшественник синтеза ФС, а катализируемая ФАЛ реакция представляет собой развилку между первичным (шикиматный путь) и вторичным специализированным метаболизмом растений.

Еще в 60-х годах прошлого века канадские биохимики Г. Тауэре, М. Юнг и А. Нейш обратили внимание на широчайшее распространение ФАЛ в растениях, а также грибах. Первая трехмерная его структура была определена для дрожжей рода *Rhodosporidium toruloides* [1]. Молекулярная масса ФАЛ составляет 76880 Да. Молекула состоит из 716 аминокислотных остатков. Оптимум рН для ФАЛ обычно находится в диапазоне от 8,2 до 9,0. Температурный оптимум составляет от 35 до 55°C в зависимости от источника получения фермента [1].

В настоящее время ФАЛ привлекает широкое внимание исследователей в связи с возможностью целенаправленной регуляции ее активности, в том числе и для повышения содержания таких биологически активных соединений как ГКК и их производные (хлорогеновая, цикорие-

вая, кафтаровая и др.). Данные вещества обладают антиоксидантной, иммуностимулирующей, противовирусной, противовоспалительной активностью.

Высоким содержанием как свободных ГКК, так и их производных характеризуются представители рода *Echinacea*, в частности *Echinacea purpurea*, лекарственное сырье которой широко используется в медицине в качестве источника препаратов для коррекции нарушений функций иммунной системы [2]. Кроме того, на основе ГКК разработана технология получения препарата «Циркон», который является ростостимулятором растений, иммуномодулятором, корнеобразователем, активатором, обладающим антистрессовым действием.

Целью настоящей работы явилось определение активности ФАЛ в клеточных культурах *Echinacea purpurea*, инкубируемых в темноте и на свету.

Объектами исследований служили каллусная и суспензионная культуры эхинацеи пурпурной. Для их культивирования была использована питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов. В качестве ауксинов питательная среда содержала 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту в концентрации 0,2 мг/л и индолилуксусную кислоту в концентрации 2,0 мг/л, а в качестве цитокининов – 0,5 мг/л кинетина.

Клеточные культуры *Echinacea purpurea* инкубировали в термостате при температуре 25°C в темноте (гетеротрофные культуры), а также на свету (фотомиксотрофные культуры) в условиях фитостата.

Определение активности ФАЛ и содержания ГКК проводили в стационарную фазу ростового цикла: на 28-30 сут (каллусная ткань) и 14-16 сут (суспензионная культура). Экстракцию ФАЛ осуществляли с помощью 0,1 М боратного буфера (pH 8,8) при температуре +4°C в течение 30 мин. Затем гомогенат центрифугировали, супернатант использовали для определения активности фермента. Активность ФАЛ определяли спектрофотометрически при 290 нм по образованию транс-коричной кислоты [3]. Количество белка в пробах измеряли по методу Брэдфорда [4]. Определение содержания ГКК в пересчете на цикориевую кислоту в клеточных культурах эхинацеи производили согласно [5].

Установлено, что значения активности ФАЛ в гетеротрофных каллусной и суспензионной культурах *Echinacea purpurea* практически не различались между собой. В результате культивирования каллусной ткани на свету происходило значительное возрастание активности ФАЛ, которое достигало 3-кратной величины относительно каллусов, длительно инкубируемых в темноте. Стимуляция работы ФАЛ отмечалась и для

выращиваемой на свету суспензионной культуры *Echinacea purpurea*. Однако стимулирующий эффект в этом случае был менее выражен по сравнению с каллусной культурой и составлял не более 2,1 раза. Можно предположить, что менее выраженный положительный эффект света на активность ФАЛ в клетках суспензионной культуры *Echinacea purpurea* обусловлен слабой агрегированностью клеток, что приводит к снижению числа межклеточных контактов и, следовательно, к менее эффективному использованию кофакторов, играющих существенную роль в клеточном метаболизме.

Анализ содержания ГКК и их производных в каллусах и клеточной суспензии эхинацеи показал, что в стационарную фазу ростового цикла уровни их накопления были в среднем в 1,8-2 раза выше в культурах, выращиваемых на свету по сравнению с аналогичными культурами, поддерживаемыми в темноте. Учитывая данные о стимулирующем влиянии света на активность ФАЛ, можно заключить, что более высокая продукция ГКК фотомиксотрофными клеточными культурами *Echinacea purpurea* обусловлена активацией их биосинтеза в результате культивирования на свету.

Полученные данные могут быть использованы при разработке режимов культивирования *Echinacea purpurea* в условиях *in vitro* в качестве источника таких биоактивных соединений как ГКК и их производные.

Литература

1. MacDonald M.J., D'Cunha G.B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase // Biochem. Cell Biol. – 2007. – Vol. 5. – P. 273 – 282.
2. Самородов В.Н., Пospelов С.В., Моисеева Г.Ф., Середа А.В. Фитохимический состав представителей рода Эхинацея (*Echinacea* Moench.) и его фармакологические свойства // Химико-фармацевтический журнал. – 1996, № 4. – С. 32–37.
3. Sauders J.A., McClure J.W. The Suitability of a Quantitative Spectrophotometric Assay for Phenylalanine Ammonia-lyase Activity in Barley, Buckwheat and Pea Seedlings // Plant Physiol. – 1974. – Vol. 54. – P. 412 – 413.
4. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248 – 254.
5. Куркин В.А., Авдеева О.И., Авдеева Е.В., Мизина П.Г. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea* // Растительные ресурсы. – 1998. – Т. 34, Вып.2. – С. 81 – 85.