Известия ТСХА, выпуск 3, 2016 год

УДК 633.11.004.12 321:631.811.1

НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗ В РАСТЕНИЯХ

Н.Н. НОВИКОВ

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

В опытах по изучению влияния различных факторов на каталитическую активность пероксидаз в реакции пероксидного окисления ти-розина установлены оптимальные условия для проведения этой ферментативной реакции: оптимальная температура — 35°С, продолжительность реакции — 15 мин., оптимальная концентрация пероксида водорода в соответствующем реактиве — 1%, количество ферментного экстракта, выделенного по установленной методике, — 3 мл, концен-трация тирозина в исходном растворе — 0,06 мг/мл. Показано, что в прорастающих зерновках пшеницы отмечается интенсивное нарастание активности пероксидаз, связанное с активным окислением продуктов распада запасных веществ, в ходе которого образуется пероксид водорода. В ростках и корешках проростков по мере их роста пероксидазная активность уменьшается, что вызвано снижением интенсивности окисления веществ с образованием пероксида водорода и активизацией синтеза жизненно важных химических соединений с его участием. В покоящихся семенах яровой мягкой пшеницы низкая активность пероксидаз была выявлена у наиболее мелких зерен с массой менее 25 мг, что свидетельствует об их низкой жизнеспособности. Наиболее высокие показатели активности пероксидаз имели прорастающие зерновки с исходной массой 25–40 мг, тогда как в ростках этой зерновой фракции активность пероксидаз была существенно ниже, чем у проростков более мелких и крупных зерен.

Ключевые слова: *яровая мягкая пшеница, определение активности пероксидаз, активность пероксидаз в проростках пшеницы.*

В ходе метаболизма в клетках и тканях растений образуются активные формы кислорода, защита от которых осуществляется высокоактивной антиоксидантной системой, включающей в себя определенный набор низко- и высокомолекулярных соединений. К группе низкомолекулярных антиоксидантов относятся дигоксин, аскорбиновая кислота, гидрохинон, мочевая кислота, мелатонин, глутатион и др. В комплекс высокомолекулярной системы антиоксидантной защиты входят ферменты, которые формируют защитные реакции растений от пероксидного окисления жизненно важных веществ и компонентов внутриклеточных структур [1, 7, 9, 10, 16].

Ключевыми ферментами антиоксидантной системы растений являются пероксидазы, которые представляют собой сложные белки-гликопротеиды, содержащие

в качестве простетической группы протогем. В клетках высших растений эти ферменты локализованы в хлоропластах и митохондриях, пероксисомах и глиоксисомах, в клеточной стенке, вакуолях, каналах шероховатого эндоплазматического ретикулума, пузырьках и цистернах аппарата Гольджи. Они катализируют окисление пероксидом водорода фенольных соединений, жирных кислот, аминокислот и аминов, терпенов, восстановленного глютатиона [3–6, 11, 14, 15, 17, 19].

Пероксидазы обладают высокой термоустойчивостью, поэтому после стерилизации растительной продукции тепловой обработкой для последующего хранения и переработки в ней определяется активность этих ферментов. Пероксидазы являются чувствительными индикаторами самых различных неблагоприятных воздействий внешней среды на растения [8, 12, 13, 18].

В существующих методиках определения активности пероксидаз ферменты выделяют из растительного материала путем экстракции обессоленной водой или фосфатным буфером. По одному из известных методов ферментативную реакцию проводят при смешивании полученного экстракта фермента с раствором бензидина и пероксида водорода. Активность фермента оценивают по интенсивности окрашивания раствора бензидиновой синью, образующейся под действием фермента из бензидина [2].

При определении активности пероксидаз также очень широко используется метод, в основу которого положена ферментативная реакция окисления пирогаллола с участием пероксида водорода. В ходе этой реакции образуется окрашенное соединение пурпурогаллин, позволяющий оценивать активность пероксидаз колориметрическим методом [11].

В указанных методиках определения активности пероксидаз расчет активности ведется по образующимся продуктам в единицах оптической плотности окрашенных растворов, тогда как по современным требованиям необходимо выражать активность ферментов в единицах, рекомендованных Международным биохимическим союзом (каталах или производных от катала единицах), которые рассчитывают по изменению концентрации субстрата, в связи с чем ведется поиск новых субстратов и методов измерения их концентрации в ходе реакций, катализируемых пероксидазами. Нами разработана новая методика определения активности пероксидаз в растениях на основе реакции пероксидного окисления аминокислоты тирозина, концентрацию которой можно измерить спектрофотометрически в ультрафиолетовом диапазоне.

Методика исследований

В ходе исследований оптимизированы условия среды при проведении ферментативной реакции пероксидного окисления тирозина, катализируемой пероксидазами, которые были выделены из прорастающих зерновок яровой мягкой пшеницы сорта Иволга при экстракции 0,05 М фосфатным буфером (pH 7). Зерновки пшеницы проращивали на воде при температуре 25°С. Навески растительного материала 1 г гомогенизировали в ступке с 10 мл фосфатного буфера и затем перемешивали на механической мешалке в течение 15 или 30 мин. Полученную смесь центрифугировали при 12000 g.

Для проведения ферментативной реакции отбирали пробы экстракта 1, 2, 3 мл. Общий объем экстракта в первых двух вариантах опыта доводили фосфатным буфером до 3 мл. В контрольных вариантах ферментные белки инактивировали, приливая

к ферментному экстракту 5 мл 10 %-ного раствора серной кислоты. К ферментному раствору в контрольных и опытных пробах приливали по 5 мл раствора тирозина с концентрацией 0,06 мг/мл и 1 мл 1%-ного или 2%-ного раствора пероксида водорода. Ферментативную реакцию проводили в терморегулируемой водяной бане при температурах 25–40°С в течение 10–30 мин. По истечении указанного времени к пробе с активным ферментом приливали 5 мл 10%-ного раствора серной кислоты для инактивации ферментов и прекращения ферментативной реакции. При необходимости полученную после проведения ферментативной реакции смесь разбавляли, добиваясь наиболее точного измерения концентрации тирозина на спектрофотометре в пределах значений оптической плотности 0,1–0,7 при длине волны 280 нм. По такому же принципу подбирали концентрацию тирозина в исходном реактиве.

С использованием разработанной нами методики была изучена динамика пероксидазной активности в прорастающих зерновках пшеницы, а также в ростках и корешках проростков. Кроме того, по активности пероксидаз в прорастающих зерновках и ростках проростков оценивались семенные качества зерновок, различающихся по массе. Активность пероксидаз выражали в нанокаталах в расчете на 1 г растительной массы (воздушно сухой массы семян и сырой массы проростков).

Статистичекую обработку экспериментального материала проводили дисперсионным методом с использованием компьютерной программы «Straz» в модификации информационно-вычислительного центра РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Версия 2.1, 1989–1991).

Результаты исследований

На первом этапе проведенных исследований выяснялось изменение пероксидазной активности в зависимости от концентрации ферментного белка. Поскольку при экстрагировании пероксидаз к навеске гомогенизированного растительного материала (зерно трехсуточных проростков) приливали 10 мл фосфатного буфера, и часть этого раствора связывается растительной пробой, для проведения реакции пероксидного окисления тирозина оказалось возможным максимально отбирать две параллельные пробы по 3 мл ферментного экстракта: одна проба — для реакции с активным ферментом, другая проба — для реакции с инактивированным ферментом (приливали 5 мл 10%-ного раствора серной кислоты).

В опыте были изучены 3 варианта, в которых для окисления тирозина пероксидом водорода брали по 1, 2 и 3 мл ферментного экстракта пероксидаз (табл. 1), при этом реакцию проводили при температуре 35°С в течение 15 мин. с использованием 1%-ного раствора пероксида водорода. Продолжительность экстракции ферментных белков на электромеханической мешалке составляла 15 мин. Как видим из данных таблицы 1, наибольшая активность пероксидаз, наблюдаемая по уменьшению оптической плотности фотометрируемой пробы (Do) по сравнению с контролем (Dк) при длине волны 280 нм, получена в варианте с 3 мл ферментного экстракта.

В соответствии с известными методиками при определении активности пероксидаз обычно используют 1%-ный раствор пероксида водорода, который добавляют в реакционную среду, содержащую ферментные белки пероксидаз и тирозин. В нашем опыте определялась активность пероксидаз как с 1%-ным раствором пероксида водорода, так и с 2%-ным раствором (табл. 2).

Как показано в данном опыте, при двукратном увеличении концентрации пероксида водорода в реакционной среде интенсивность окисления тирозина не повы-

Таблица 1

Активность пероксидаз в прорастающих зерновках пшеницы при изменении концентрации ферментных белков

Объем экстракта для проведения ферментативной реакции, мл	Оптическая плотность фотометрируемой пробы (E_{280})		Δ(Dк–Do)	Активность пероксидаз, нкат в расчете на 1 г сырой массы
	вариант с инактивированными ферментами (Dк)	вариант с активными ферментами (Do)		
1	0,25 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,02	3,8
2	0,35 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,03	5,7
3	0,46 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,06	11,3

Таблица 2

Активность пероксидаз в прорастающих зерновках пшеницы при изменении концентрации пероксида водорода

Концентрация пероксида водорода в составе применяемого реактива, %	Оптическая плотность фотометрируемой пробы (E_{280})		Δ(Dк–Do)	Активность пероксидаз,нкат в расчете на 1 г сырой массы
	вариант с инактивированными ферментами (Dк)	вариант с активными ферментами (Do)		
1	0,41 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,10	18,8
2	0,40 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,10	18,8

шалась. Таким образом, при определении активности пероксидаз по рассматриваемой методике вполне достаточно использовать 1%-ный раствор пероксида водорода.

В разработанных ранее методах определения активности пероксидаз оптимальная температура при проведении ферментативной реакции принималась равной 25°С. Но для нового субстрата (тирозина) температурный оптимум ферментативной реакции необходимо было выяснить экспериментальным путем, в связи с чем активность фермента определяли при температурах 25, 30, 35 и 40°С. Как следует из представленных данных (табл. 3), наибольшая активность фермента наблюдалась при температуре ферментативной реакции 35°С.

Большинство ферментативных реакций обратимы, поэтому определение каталитической активности ферментов рекомендуется проводить по начальной скорости реакции за короткий промежуток времени, так как при увеличении времени инициируется обратная реакция, которая вносит ошибку в определение активности фермента. В нашем опыте пероксидазную реакцию окисления тирозина проводили в течение 10, 15, 20 и 25 мин. (табл. 4). Наиболее высокая активность пероксидаз выявлена в варианте, где время ферментативной реакции составляло 15 мин.

В различных исследованиях при определении активности пероксидаз время экстракции фермента обычно варьирует в пределах от 15 до 30 мин. В нашем опы-

Таблица 3

Активность пероксидаз в прорастающих зерновках пшеницы в зависимости от температуры при проведении ферментативной реакции

Температура при проведении ферментативной реакции, °С	Оптическая плотность фотометрируемой пробы (E_{280})		$\Delta(D_к - D_о)$	Активность пероксидаз, нкат в расчете на 1 г сырой массы
	вариант с инактивированными ферментами ($D_к$)	вариант с активными ферментами ($D_о$)		
25	0,46 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,06	11,3
30	0,43 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,06	11,3
35	0,32 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,08	15,0
40	0,29 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,07	13,2

Таблица 4

Активность пероксидаз в прорастающих зерновках пшеницы в зависимости от продолжительности ферментативной реакции

Продолжительность ферментативной реакции, минуты	Оптическая плотность фотометрируемой пробы (E_{280})		$\Delta(D_к - D_о)$	Активность пероксидаз, нкат в расчете на 1 г сырой массы
	вариант с инактивированными ферментами ($D_к$)	вариант с активными ферментами ($D_о$)		
10	0,33 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,02	3,8
15	0,46 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,06	11,3
20	0,48 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,03	5,7
25	0,49 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,04	7,5

те изучено два варианта, отличающихся по времени экстракции из растительного материала ферментных белков: 15 и 30 мин. Полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что увеличение времени экстракции ферментных белков существенно не повлияло на активность пероксидаз (табл. 5). Поэтому для выделения ферментных белков пероксидаз из гомогенизированного растительного материала достаточно провести их экстракцию при перемешивании на электромеханической мешалке в течение 15 мин.

Таким образом, в ходе лабораторных исследований были оптимизированы время экстракции фермента, концентрация ферментных белков и пероксида водорода, а также условия среды при определении активности пероксидаз в растениях на основе реакции пероксидного окисления аминокислоты тирозина. Рекомендуется проводить экстракцию ферментных белков при перемешивании на электромехани-

Таблица 5

Активность пероксидаз в прорастающих зерновках пшеницы в зависимости от времени экстракции ферментных белков

Время экстракции ферментных белков, мин.	Оптическая плотность фотометрируемой пробы (E_{280})		Δ(Dк–Do)	Активность пероксидаз, нкат в расчете на 1 г сырой массы
	вариант с инактивированными ферментами (Dк)	вариант с активными ферментами (Do)		
15	0,39 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,10	18,8
30	0,40 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,10	18,8

ческой мешалке в течение 15 мин. Для проведения ферментативной реакции необходимо вносить в реакционную среду 3 мл экстракта пероксидаз, выделенного из 1 г растительной массы в 10 мл 0,05 М фосфатного буферного раствора. При определении активности пероксидаз вполне достаточно вносить в реакционную среду 1 мл 1%-ного раствора пероксида водорода. Оптимальная температура для осуществления реакции пероксидного окисления тирозина с участием пероксидаз — 35°С, оптимальная длительность ферментативной реакции — 15 мин.

С использованием разработанной нами методики была изучена динамика пероксидазной активности в прорастающих зерновках, ростках и корешках проростков яровой мягкой пшеницы (табл. 6). Минимальный уровень активности этого фермента отмечен в покоящихся зерновках пшеницы (не пророщенное зерно). В зерне трехсуточных проростков отмечалось существенное увеличение активности пероксидаз (в 1,6 раза), свидетельствующее об активизации в них биохимических процессов с участием этих ферментов. В ходе дальнейшего прорастания зерновок их пероксидазная активность продолжала нарастать: на 5-е сут. она увеличилась по сравнению с не пророщенным зерном в 3,2 раза, а на 7-е сут. — в 3,3 раза.

Наблюдаемое в прорастающих зерновках пшеницы увеличение активности пероксидаз обусловлено тем, что в них активно происходят реакции окисления продуктов распада жирных кислот, аминокислот и других органических веществ, в ходе которых образуется пероксид водорода, вызывающий индукцию синтеза ферментных белков пероксидаз.

Таблица 6

Активность пероксидаз в проростках яровой мягкой пшеницы
(нкат в расчете на 1 г растительной массы)

Части проростков	Не пророщенные зерновки	Продолжительность проращивания (в сутках)			$НСР_{05}$
		3 сут.	5 сут.	7 сут.	
Зерно	6,5	10,3	20,5	21,5	1,0
Корешки	—	12,2	11,3	9,3	1,1
Ростки	—	37,5	30,3	16,7	3,3

У трехсуточных проростков довольно высокий уровень активности пероксидаз выявлен в корешках, и особенно ростках, что указывает на интенсивность проходящих в них реакций пероксидного окисления веществ, связанных с инициацией физиолого-биохимических процессов роста и развития проростков. Однако в дальнейшем (к 5–7 сут. прорастания) в них происходит значительное понижение пероксидазной активности (в корешках в 1,3 раза, в ростках — в 2,2 раза), что, очевидно, обусловлено понижением интенсивности биохимических реакций распада и окисления веществ с образованием пероксида водорода, а также усилением образования жизненно важных химических соединений с участием пероксида водорода, в результате чего его концентрация понижается, вызывая ослабление синтеза ферментных белков пероксидаз, входящих в систему антиоксидантной защиты.

В проведенных лабораторных опытах было установлено, что в покоящихся семенах яровой мягкой пшеницы низкая активность пероксидаз была характерна для наиболее мелких зерен с массой менее 25 мг, что свидетельствует об их более низкой жизнеспособности (табл. 7). Наиболее высокие показатели активности пероксидаз на 7-е сут. прорастания имели зерновки с исходной массой 25–40 мг, тогда как меньшая активность этих ферментов отмечалась в самых мелких (с исходной массой менее 25 мг) и в самых крупных (с исходной массой более 40 мг) прорастающих зернах.

Таблица 7

Активность пероксидаз в прорастающих зерновках и ростках яровой мягкой пшеницы, полученных из зерен с различной массой (нкат в расчете на 1 г растительной массы)*

Масса зерен, мг	Не пророщенные зерновки	7-суточные проростки	
		прорастающие зерновки	ростки
<25	9,3	23,3	17,2
25–30	19,5	27,3	12,0
31–35	17,5	30,8	11,5
36–40	20,7	33,0	9,8
>40	21,2	25,0	16,2

*$НСР_{05}$ по фактору массы зерен = 3,3.
*$НСР_{05}$ по фактору прорастающих зерновок и ростков = 3,3.

Изучение пероксидазной активности в ростках проростков разных фракций зерна показало, что она существенно выше у проростков наиболее мелких и крупных зерен и значительно ниже у проростков зерен с исходной массой 25–40 мг, у которых повышена активность пероксидаз в прорастающем зерне. Последнее свидетельствует о том, что в ростках указанной зерновой фракции более активно происходят реакции синтеза и превращения веществ с потреблением пероксида водорода. Таким образом, можно ожидать, что фракции зерновок пшеницы с массами 25–40 мг, отличающихся более высокой пероксидазной активностью в процессе прорастания, будут иметь повышенную жизнеспособность при их использовании в качестве семенного материала.

Выводы

1. В опытах по изучению влияния внешних и внутренних факторов на каталитическую активность пероксидаз в реакции пероксидного окисления тирозина установлено, что для осуществления ферментативной реакции вполне достаточно брать 3 мл белкового экстракта, выделенного из растительной пробы по установленной методике; оптимальная температура при проведении ферментативной реакции — 35°С, продолжительность реакции — 15 мин., оптимальная концентрация пероксида водорода в соответствующем реактиве — 1%.

2. В процессе прорастания в зерновках пшеницы отмечается интенсивное нарастание активности пероксидаз, в 3-суточных проростках — в 1,6 раза, 5-суточных — в 3,1 раза, 7-суточных — в 3,3 раза. Последнее свидетельствует о том, что в прорастающем зерне активизируются биохимические реакции окисления продуктов распада запасных веществ, в ходе которых образуется пероксид водорода, вызывающий индукцию синтеза пероксидаз.

3. Изучение действия пероксидаз в ростках и корешках проростков пшеницы показало, что в процессе роста и развития в них происходит значительное уменьшение пероксидазной активности, которое вызвано снижением интенсивности биохимических реакций окисления веществ с образованием пероксида водорода и активизацией синтеза жизненно важных химических соединений с его участием, в результате чего концентрация пероксида водорода понижается, вызывая ослабление синтеза ферментных белков пероксидаз.

4. В покоящихся семенах яровой мягкой пшеницы низкая активность пероксидаз была выявлена у наиболее мелких зерен с массой менее 25 мг, что свидетельствует об их низкой жизнеспособности. Наиболее высокие показатели активности пероксидаз на 7-е сут. прорастания имели зерновки с исходной массой 25–40 мг, и значительно меньшая активность этих ферментов отмечалась во фракциях прорастающих зерен с исходной массой менее 25 мг и более 40 мг.

5. В ростках указанных фракций зерна наблюдается обратная закономерность: активность пероксидаз была существенно выше в проростках наиболее мелких и крупных зерен и значительно ниже в проростках зерен с исходной массой 25–40 мг, у которых повышена активность этих ферментов в прорастающем зерне, что свидетельствует о более активном синтезе и превращениях веществ с потреблением пероксида водорода в ростках указанной зерновой фракции.

Библиографический список

1. *Андреева В.А.* Фермент пероксидаза. Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 129 с.

2. *Бояркин А.Н.* Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия. 1951. Т. 16. Вып. 4. С. 352–355.

3. *Воронков Л.А., Живописцева И.В.* Изучение каталитических свойств пероксидазы хлоропластов // Физиология и биохимия здорового и больного растения. М.: Изд-во МГУ, 1970. С. 305–311.

4. *Иванова З.А., Вафина Г.Х.* Физиологическая роль пероксидазной активности клеточных ядер на ранних этапах онтогенеза растений // Физиология и биохимия культурных растений. 1997. Т. 29. № 2. С.129–132.

5. *Карташова Е.Р., Руденская Г.П., Юрина Е.В.* Полифункциональность растительных пероксидаз и их практическое использование // Сельскохозяйственная биология. 2000, № 5. С. 63–70.

6. *Лебедева О.В., Угарова Н.Н.* Механизм пероксидазного окисления. Субстрат — субстратная активация в реакциях, катализируемых пероксидазой хрена // Известия РАН. Серия химич. 1996. № 1. С. 25–32.

7. *Новиков Н.Н.* Биохимия растений: Учебник. 2-е изд. М.: ЛЕНАНД, 2014. 680 с.

8. *Новиков Н.Н.* Биохимические основы формирования качества продукции растениеводства: учебное пособие. М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2014. 194 с.

9. *Новиков Н.Н., Таразанова Т.В.* Лабораторный практикум по биохимии растений. М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2012. 97 с.

10. *Рогожин В.В.* Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб., 2004. 240 с.

11. *Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Кирилюк Т.Т.* Антиоксидантная система в прорастании семян пшеницы // Известия АН. Серия биологич. 2001. № 2. С. 165–173.

12. *Рогожин В.В., Курилюк Т.Т.* Влияние ультрафиолетового облучения семян на процессы перекисного окисления липидов в проростках пшеницы // Биохимия. 1996. Т. 61. № 8. С. 1432–1439.

13. *Савич И.М.* Пероксидазы — стрессовые белки растений // Успехи современной биологии. 1989. Т. 107. Вып. 3. С. 406–417.

14. A biochemical and cytochemical study of the cuticle-associated peroxidases in Lupines / M.A. Ferrer, R. Menoz, A.Ros Barcelo // Ann. Bot.1991. Vol. 67, № 3. P. 561–568.

15. *Chance B.* The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes // Arch. Biochem. Biophys. 1952. Vol. 41. № 2. P. 416–424.

16. *Inze D., Montague M.* Oxidative stress in plants // Curr. Opin. Biotechnol. 1995. Vol. 6. P. 153–158.

17. *Raa J.* Cytochemical localization of peroxidase in plant cells // Physiol, plant. 1973. Vol. 28. № 1. P. 132–133.

18. *Regalado C., García-Almendárez B.E., Duarte-Vázquez M.A.* Biotechnological applications of peroxidases // Phytochem. Rev. 2004. Vol. 3. № 1–2. P. 243–256.

19. Some aspects of peroxidase synthesis by cultured peanut / D. Stephan, R.B. van Huystee // Z. Pflanzenphysiol. 1981. Vol. 101. № 2. P. 313–319.

THE NEW METHOD OF PEROXYDASES ACTIVITY DETERMINATION IN PLANTS

N.N. NOVIKOV

(Russian Timiryazev State Agrarian University)

In the experiments with spring soft wheat seedlings the optimal conditions have been revealed for the fermentative reaction of tyrosine peroxide oxidation under peroxidases catalytic action: optimal temperature – 35°C, reactions duration – 15 minutes, optimal concentration of hydrogen peroxide in corresponding reagent – 1%, the amount of enzymes extract prepared in designate procedure – 3 ml, tyrosine concentration in the parent solution – 0.06 mg/ml. It was shown that high level of peroxidases activity increase in growing seeds is connected with active oxidation of store substances degradation products, which results in hydrogen peroxide. In roots and vegetative organs during their growth the activity of this enzyme is decreasing. It is induced by lowering of substances oxidation intensity with hydrogen peroxide formation and initiation of vital chemical compounds synthesis with its participation. In mellow seeds of spring soft wheat low peroxidases activity was obtained in smaller grains with the mass less than 25 mg showing their low vitality.

The higher level of peroxidases activity has been estimated in germinating seeds with initial mass of 25–40 mg, but enzymes activity decreased in vegetative organs of seedlings grown from such grains compared to the ones from smaller or bigger grains.

Key words: *spring soft wheat, peroxidases activity determination, peroxidases activity in wheat seedlings.*

References:

1. *Andreeva V.A.* Ferment peroksidaza. Uchastie v zashchitnom mekhanizme rasteniy [Peroxidase enzyme. The role in the defense mechanism of plants]. Moscow.: Nauka, 1988. 129 p.

2. *Boyarkin A.N.* Bystryy metod opredeleniya aktivnosti peroksidazy [Quick method for determining peroxidase activity]. Biokhimiya [Biochemistry]. 1951. Vol. 16. № 4. P. 352–355.

3. *Voronkov L.A., Zhivopistseva I.V.* Izuchenie kataliticheskikh svoystv peroksidazy khloroplastov [The study of the catalytic properties of peroxidase chloroplasts]. Fiziologiya i biokhimiya zdorovogo i bol'nogo rasteniya [Physiology and biochemistry of healthy and diseased plants]. Moscow: Publishing House of Moscow State University. 1970. P. 305–311.

4. *Ivanova 3.A., Vafina G.Kh.* Fiziologicheskaya rol' peroksidaznoy aktivnosti kletochnykh yader na rannikh etapakh ontogeneza rasteniy [The physiological role of peroxidase activity of cell nuclei in the early stages of plant ontogenesis]. Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rasteniy [Physiology and biochemistry of cultivated plants]. 1997. Vol. 29. № 2. P. 129–132.

5. *Kartashova E.R., Rudenskaya G.P., Yurina E.V.* Polifunktsional'nost' rastitel'nykh peroksidaz i ikh prakticheskoe ispol'zovanie [Polyfunctionality of plant peroxidases and their practical use]. Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]. 2000. № 5. P. 63–70.

6. *Lebedeva O.V., Ugarova N.N.* Mekhanizm peroksidaznogo okisleniya. Substrat — substratnaya aktivatsiya v reaktsiyakh, kataliziruemykh peroksidazoy khrena [The mechanism of peroxidase-catalyzed oxidation. Substrate — substrate activation in reactions catalyzed by horseradish peroxidase]. Izvestiya RAN. Seriya khimich [Journal of the Russian Academy of Sciences, Chemical sciences series]. 1996. № 1. P. 25–32.

7. *Novikov N.N.* Biokhimiya rasteniy: Uchebnik. 2-e izd [Plant Biochemistry]. Textbook, 2nd edition. Moscow: LENAND. 2014. 680 p.

8. *Novikov N.N.* Biokhimicheskie osnovy formirovaniya kachestva produktsii rastenievodstva: uchebnoe posobie [Biochemical bases of the quality formation of crop production]. Moscow: Publishing House of Russian Timiryazev State Agrarian University. 2014. 194 p.

9. *Novikov N.N., Tarazanova T.V.* Laboratornyy praktikum po biokhimii rasteniy [Laboratory course on plant biochemistry]. Moscow: Publishing House of Russian Timiryazev State Agrarian University. 2012. 97 p.

10. *Rogozhin V.V.* Peroksidaza kak komponent antioksidantnoy sistemy zhivykh organizmov [Peroxidase as a component of the antioxidant system of living organisms]. St. Petersburg. 2004. 240 p.

11. *Rogozhin V.V., Verkhoturov V.V., Kirilyuk T.T.* Antioksidantnaya sistema v prorastanii semyan pshenitsy [Antioxidant system in the germination of wheat seeds]. Izvestiya RAN. Seriya biologich [Journal of the Russian Academy of Sciences, Biological sciences series]. 2001. № 2. P. 165–173.

12. *Rogozhin V.V., Kurilyuk T.T.* Vliyanie ul'trafioletovogo oblucheniya semyan na protsessy perekisnogo okisleniya lipidov v prorostkakh pshenitsy [Effect of ultraviolet irradiation of seeds on lipid peroxidation processes in wheat seedlings.]. Biokhimiya [Biochemistry]. 1996. Vol. 61. № 8. P. 1432–1439.

13. *Savich I.M.* Peroksidazy — stressovye belki rasteniy [Peroxidases are stress proteins of plants]. Uspekhi sovremennoy biologii [Progress in modern biology]. 1989. Vol. 107. №. 3. P. 406–417.

14 A biochemical and cytochemical study of the cuticle-associated peroxidases in Lupines / M.A. Ferrer, R. Menoz, A. Ros Barcelo // Ann. Bot. 1991. Vol. 67. № 3. P. 561–568.

15. *Chance B.* The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes // Arch. Biochem. Biophys. 1952. Vol. 41. № 2. P. 416–424.

16. *Inze D., Montague M.* Oxidative stress in plants // Curr. Opin. Biotechnol. 1995. Vol. 6. P. 153–158.

17. *Raa J.* Cytochemical localization of peroxidase in plant cells // Physiol, plant. 1973. Vol. 28. № 1. P. 132–133.

18. *Regalado C., García-Almendárez B.E., Duarte-Vázquez M.A.* Biotechnological applications of peroxidases // Phytochem. Rev. 2004. Vol. 3. № 1–2. P. 243–256.

19. Some aspects of peroxidase synthesis by cultured peanut / D. Stephan, R.B. van Huystee // Z. Pflanzenphysiol. 1981. Vol. 101. № 2. P. 313–319.

Новиков Николай Николаевич — д. б. н., проф. кафедры агрономической, биологической химии, радиологии и безопасности жизнедеятельности РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-29-71, (499) 976-16-60; e-mail: tshanovikov@gmail.com).

Novikov Nikolai Nikolaevich — Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Agronomic, Biological Chemistry, Radiology and Life Safety, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Russia, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; tel.: +7 (499) 976-29-71, +7 (499) 976-16-60; e-mail: tshanovikov@gmail.com).