

# ОГЛЯДИ

УДК 577.121.5/6

## МЕТАБОЛІЧНИЙ ШЛЯХ МЕТАНОЛУ У РОСЛИН

С. С. СТЕПАНОВ, О. К. ЗОЛОТАРЬОВА

*Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;  
e-mail: serhiy1986@ukr.net*

*В огляді висвітлено метаболізм метанолу в рослинах. Первинними метаболітами метанолу, які включаються в анаболічні процеси, є продукти його окислення – формальдегід і форміат. Охарактеризовано ензими, які беруть участь у послідовному окисленні метанолу, і ензими, котрі забезпечують включення вуглецю молекули метанолу в метильні групи фосфоліпідів, карбонових кислот та вуглеводів. Особливість рослинних організмів полягає у взаємодії реакцій перетворення метанолу із шляхами фотодихання і  $C_1$ -метаболізму, а також в їхній здатності використовувати вуглець метанолу для утворення органічних речовин в ході фотосинтезу. Зроблено висновок, що екзогенний метанол у невисоких концентраціях не токсичний для рослин, а навпаки, може стимулювати їхню фотосинтетичну продуктивність.*

*Ключові слова: метанол, форміат, фотосинтетична продуктивність, фотодихання,  $C_1$ -метаболізм.*

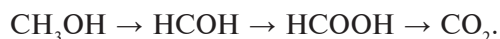
В останні роки значна увага приділяється біохімічним шляхам автотрофного живлення рослин, що забезпечують перетворення сонячної енергії в енергію хімічних зв'язків і накопичення біомаси. Завдяки трансгенній модифікації можливо контролювати вуглецевий метаболізм та ріст рослин, впливаючи, таким чином, на врожайність незалежно від кліматичних умов. Іншим перспективним напрямом впливу на рослини з метою підвищення врожайності, є використання природних добавок, стимуляторів росту, проростання, дозрівання плодів тощо. Накопичено дані, котрі засвідчують вплив простих органічних речовин (аміно- та карбонових кислот, спиртів) на фотосинтетичну продуктивність рослин. Однак біохімічні аспекти підвищення продуктивності під впливом тих чи інших речовин висвітлено недостатньо. Відомо, що продуктивність фотосинтезу залежить від багатьох факторів і може підвищуватися внаслідок цілеспрямованого впливу на різні метаболічні шляхи. Фотосинтетична продуктивність рослин залежить від рівноваги реакцій дихання, фотодихання та світлової фіксації  $CO_2$ , оскільки саме ці процеси відповідають за інтенсивність фіксації неорганічного та перерозподіл органічного вуглецю.

Результати досліджень, що стосуються впливу низькомолекулярних одноатомних спиртів, зокрема метанолу, на ріст і продуктивність рослин досить суперечливі. Низка дослідників відмічає підвищення їхньої фотосинтетичної продуктивності у разі додавання метанолу [1, 2]. Рослини з  $C_3$ -типом фотосинтезу реагують на метанол підвищенням ефективності фотосинтезу і збільшенням врожайності [3]. Рослини, для яких характерний  $C_4$ -тип фотосинтезу, толерантні до впливу субтоксичних концентрацій метанолу [4]. Інші дослідники відмічають стимулювальний вплив метанолу на рослини  $C_3$ -типу лише за умов водного дефіциту [5]. У низці досліджень не вдалося виявити стимулювального впливу метанолу на фотосинтетичну продуктивність [6, 7]. Мікродорості реагують на екзогенний метанол зменшенням періоду генерації клітин і підвищенням приросту біомаси подібно до рослин із  $C_3$ -типом фотосинтезу [8]. Зважаючи на суперечливий характер результатів щодо впливу метанолу на рослини, слід охарактеризувати біохімічні шляхи і реакції, що лежать в основі метаболізму метанолу. Детальний огляд метаболічних реакцій біоконверсії метанолу рослинами й їх взаємозв'язку з метаболізмом клітин в нормальних чи стресових умовах дозволить виявити біохімічну основу механізму

підвищення продуктивності рослин шляхом додавання метанолу.

Тому мета даного огляду – охарактеризувати реакції, ензими, метаболічні шляхи перетворення метанолу в рослинних клітинах.

**Метаболізм метанолу.** Внаслідок метаболізму метанолу в різних організмів утворюються однакові продукти, але відповідають за це різні ензими. Для рослин, тварин, грибів та бактерій характерний загальний шлях окислення метанолу:



У процесі окислення утворюються реакційно активні сполуки – формальдегід і форміат, з якими пов'язують токсичний вплив метанолу на живі організми. Кінцевим продуктом метаболізму є  $\text{CO}_2$  (рис. 1). Метанол здатен окислюватися в живих організмах з утворенням формальдегіду і форміату неензиматично за дії активних форм кисню або ензиматично за участю каталази, алкогольдегідрогенази і метанолоксидази. Так, у приматів переважає алкогольдегідрогеназа, тоді як у личинок дрозофіли і у гризунів окислення метанолу відбувається за участю каталази. Метанол у невеликих концентраціях (0,5 об'ємних відсотка) може використовуватись метилотрофними грибами (*Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) як джерело вуглецю та енергії [9]. Дріжджі здатні швидко окислювати метанол за участю метанолоксидази з утворенням  $\text{H}_2\text{O}_2$  і формальдегіду.  $\text{H}_2\text{O}_2$  окислює формальдегід до форміату. Форміат далі окислюється форміатдегідрогеназою, при цьому відновлюється  $\text{NAD}^+$ , котрий передає електрони на електронно-транспортний ланцюг мітохондрій, забезпечуючи синтез АТР. У метилотрофних бактерій метанол також швидко метаболізується шляхом безпосередньої передачі електронів на електронно-транспортний ланцюг плазматичної мембрани, активуючи спряжений синтез АТР. Очевидно, вищі рослини також здатні використовувати метанол як джерело вуглецю і енергії паралельно з автотрофною фіксацією  $\text{CO}_2$ . Окрім лінійного шляху окислення метанолу для рослин характерний розгалужений шлях метаболізму завдяки здатності формальдегіду і форміату до конденсації з переносниками одновуглецевих сполук, внаслідок чого метанол асимілюється в реакціях фотодихання і  $\text{C}_1$ -метаболізму [4].

У зв'язку з високим відновним потенціалом фотосинтезуючої рослинної клітини проміжні продукти метаболізму метанолу входять в анаболічні процеси, не встигаючи окислитись до  $\text{CO}_2$ . Повне окислення



Рис. 1. Схема окислення і асиміляції метанолу рослинами. МО – метанолоксидаза, АДГ – алкогольдегідрогеназа, ФАДГ – формальдегіддегідрогеназа, ФДГ – форміатдегідрогеназа, КАТ – каталаза (за R. Fall, A. Venson, 1996) [4]

метанолу підвищує локальну концентрацію  $\text{CO}_2$  у клітині, що створює оптимальні умови для карбоксилазної активності рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилази/оксигенази (RUBISCO, EC 4.1.1.39).

**Рослини – продуценти метанолу.** Метанол – одна з найпоширеніших летких органічних сполук в атмосфері (концентрація 1–10 об'ємних частин на мільйон, концентрація в морській воді 0,5–1,5 об'ємних частин на мільйон) [10]. Він впливає на хімічний склад атмосфери, взаємодіючи з окисниками. Внаслідок такої взаємодії збільшується концентрація формальдегіду, озону, пероксидного радикалу і знижується концентрація ОН-радикалу [11]. За відсотковим вмістом 11–20% метанолу в атмосфері має антропогенне, а 80–89% – біогенне походження [12, 13]. Процеси, що призводять до біогенного утворення метанолу, різноманітні.

Значна частина метанолу виділяється рослинами протягом їхнього росту [4, 14, 15]. Стресорні впливи на рослини, такі як заморожування, гіпоксія, висока концентрація озону спричиняють виділення метанолу. [16, 17]. Старіння, пошкодження (зумовлене шкідниками або пораненням), висушування листя, спалювання рослинної біомаси також підвищують виділення метанолу в атмосферу [18–23]. У невеликій кількості метанол може виділятися під час метаболізму лігніну, деметилуванні ДНК [13] і деградації протеїнів [4].

Автори виявили [23], що метанол продукується всередині листків здебільшого внаслідок деметилювання пектинового матриксу – процесу, що відповідає за перебудову клітинних оболонок протягом росту рослин. На основі вмісту пектинів описано два типи клітинних оболонок [13] – з високим і низьким потенціалом виділення метанолу. Наприклад, у зернових з родини злакові потенціал виділення метанолу низький в зв'язку з низьким вмістом пектину в оболонках.

Добовий розподіл швидкості виділення метанолу для трав'янистих рослин має два максимуми – ввечері і зранку, і два мінімуми – протягом ночі і опівдні. Цей цикл спостерігали на всіх етапах онтогенезу трав'янистих рослин [24]. У разі виділення метанолу з аксіальної і субаксіальної поверхні листків встановлено [25], що більше метанолу виділяється з поверхні листка, де є продихи. Виділення метанолу позитивно корелює з інтенсивністю світла і з асиміляцією  $\text{CO}_2$  ( $r = 0,64$  і  $r = 0,66$  відповідно). Найзначніша кореляція виявлена між продиховою провідністю і виділенням метанолу ( $r = 0,89$ ). Також було встановлено кореляцію між виділенням метанолу і температурою [25]. Авторі пов'язують кореляцію виділення метанолу із продиховим опором високою розчинністю метанолу у воді. При закритих продихах відбувається його накопичення в апопласті і виділення в атмосферу під час транспірації. Виділення метанолу звичайно становило  $34$  пг на  $1$  г сухої ваги за годину. Внаслідок зрізування черешка або у разі додавання абсцизової кислоти (АБК) спостерігалось закриття продихів, але виділення метанолу зменшувалося не відразу, а із затримкою. У досліджах [15] спостерігали зменшення виділення метанолу з віком рослин. Свіжі листки містять  $26,8 \pm 14,6$ , а старі –  $10 \pm 3,8$  пг метанолу на  $1$  г сухої маси.

Пектинестераза (пектин-пектилгідролаза, ЕС 3.1.1.11, ПЕ) – ензим клітинної оболонки, що відповідає за перебудову пектинового

матриксу. ПЕ каталізує деметилювання гомогалактуронана в положенні С-6 (рис. 2). Внаслідок реакції утворюється метанол і негативно заряджена карбоксильна група пектату, яка може приєднуватись до іншого ланцюга гомогалактуронана за участю кальцію, що робить клітинну оболонку жорсткішою [26].

ПЕ бере участь у процесах, асоційованих із ростом і розвитком, таких як: ріст коренів, перебудова клітинної оболонки, проростання насіння, дозрівання плодів, ріст пилкової трубки тощо [27]. Також ПЕ відіграє важливу роль у захисті рослин від багатьох патогенних бактерій і грибів. Рослини *Arabidopsis thaliana* з редукованою активністю ПЕ виявляють вищий рівень метилювання пектину і більш стійкі до враження *Botrytis cinerea* [28]. Повідомляють також, що ПЕ бере участь у захисті проти травоядних шкідників. У багатьох рослин індукується синтез мРНК і поліпептидів ПЕ за пошкодження рослин травоядними тваринами [29–31]. Як наслідок, збільшується виділення метанолу рослиною. Таким чином, ПЕ відіграє важливу роль в індукції захисної відповіді рослини на стрес, зумовлений пораненням, і забезпечує виділення метанолу.

**Окислення метанолу.** Концентрація метанолу в тканинах рослин близько  $1$  мкмоль на  $1$  г вологої маси. Вільний метанол бере участь у вторинному метаболізмі рослин, захищає рослину від пошкодження реакційними сполуками кисню (ROS) і нітрогену (NOS). Зміна внутрішньоклітинної концентрації метанолу впливає на експресію низки рослинних генів, які відповідають як за метаболічні, так і за регуляторні шляхи. Метанол виконує функцію сигнальної молекули під час різноманітних впливів стресорів на рослини, таких як гіпоксія, поранення, зневоднення. Також метанол є посередником у разі взаємодії рослин з метилотрофною мікрофлорою [32].

Як згадувалося вище, ПЕ забезпечує утворення ендogenous метанолу. У тканинах бульб картоплі метанол може утворюватись

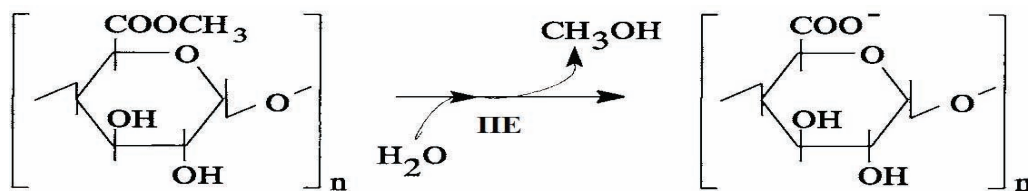


Рис. 2. Реакція деметилювання пектинового матриксу. ПЕ – пектин естераза (за I. E. Galbally, W. Kirstine, 2002) [13]

за дисмутації або відновлення формальдегіду [33]. Біохімічну основу перетворення метанолу у формальдегід для рослин досі нез'ясовано. Оскільки особливого ензиму для перетворення метанолу не виявлено, існує декілька можливих шляхів перебігу цієї реакції.

Алкогольдегідрогеназа рослин (алкоголь:NAD<sup>+</sup> оксидоредуктаза, EC 1.1.1.1, АДГ) каталізує NAD-залежне окислення метанолу до формальдегіду.

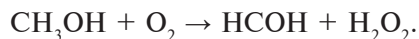


У доступній літературі відсутні експериментальні дані щодо участі рослинної алкогольдегідрогенази в метаболізмі метанолу. Але АДГ приматів характеризується високим ступенем гомології до АДГ рослин і здатна каталізувати окислення метанолу. АДГ експресується на ранніх етапах розвитку рослин, у дорослих рослин експресія індукується у відповідь на стрес. Рослини відповідають на дію стресорних чинників низкою фізіологічних і біохімічних змін, що підвищують їхні шанси на виживання за несприятливих умов. Такими адаптивними змінами є активація синтезу *de novo* протеїнів стресу. Ген АДГ *Arabidopsis thaliana* індукується за гіпоксії, зневодненні і при низьких температурах [33, 34]. Було визначено елементи промотору гену АДГ арабідопсиса, відповідальні за реакцію на ці три види природного стресу [35–37].

За аналогією з умовним поділом АДГ людини, у рослин виділяють АДГ Р і АДГ ІІІ. Алкогольдегідрогенази Р рослин характеризуються субстратною специфічністю до етанолу, тоді як алкогольдегідрогенази ІІІ (глутатіонзалежні форміатдегідрогенази) специфічні до S-гідроксиметилглутатіону. У процесі дуплікації і еволюції промотори генів АДГ Р набули здатності реагувати на різноманітні транскрипційні сигнали у відповідь на стрес чи додавання АБК, в той самий час експресія родоначальних генів АДГ ІІІ конститутивна і однакова для різних тканин організму рослини.

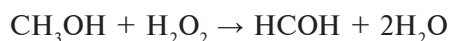
У зв'язку з низькою спорідненістю АДГ до метанолу і незначним вмістом ензиму в тканинах рослин, активністю АДГ Р у метаболізмі метанолу можна знехтувати, принаймні за нормальних умов.

У рослин очевидно відсутня метанолоксидаза (алкоголь:окисген оксидоредуктаза, EC 1.1.3.13), яка каталізує реакцію, характерну для метилотрофних організмів [38]:

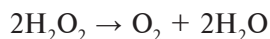


Однак за результатами недавніх досліджень, утворення H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, у відповідь на додавання 50 мМ екзогенного метанолу, пов'язують з активністю метанолоксидази, оскільки, інгібітор метанолоксидази – дифеніленійодоній (DPI) на 8% зменшував виділення H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Гідроксиламін (інгібітор NADH:оксидази) зменшував утворення H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 20% [39]. Таким чином, метанолоксидаза якщо і бере участь у метаболізмі метанолу, то її вклад в окислення гідроксиламіну до формальдегіду у порівнянні з іншими шляхами є незначним.

Окислення метанолу у рослин відбувається за участю H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> неензиматично або завдяки пероксидазній активності каталази (гідрогенпероксид: гідрогенпероксид оксидоредуктаза, EC 1.11.1.6).



У вищих рослин каталаза локалізована в пероксисомах. В цих органелах H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> є побічним продуктом окислення гліколату в циклі фотодихання і елімінується за участю каталази. Одноклітинні зелені водорості, зокрема *Chlamydomonas reinhardtii*, не мають пероксисом, а каталаза, як і інші ензими захисту від реакційних сполук кисню, локалізована у хлоропластах і мітохондріях. Також у *C. reinhardtii* відсутня гліколатоксидаза, внаслідок чого пропускна здатність циклу фотодихання і активність каталази знижені [41].



Крім дисмутації пероксиду водню, що супроводжується виділенням кисню, каталаза здатна відновлювати H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> з використанням метанолу, етанолу або діамінбензидину, тобто виявляє неспецифічну пероксидазну активність, яка зростає за збільшення концентрації ензиму і його субстратів [40]. Пероксидази рослин характеризуються високою субстратною специфічністю до молекули відновника, тому мають низьку спорідненість до метанолу і не здатні каталізувати його окислення. Як і в інших живих організмах в рослинах виявлено ізоформи каталази, які розрізняють за молекулярною масою або ізоелектричною точкою [42].

Швидкість елімінування метанолу із середовища культивування становить 0,2 мкмоль за 1 год на 1 г вологої маси у разі додавання 5 мМ метанолу до суспензії клітин клена [43]. Низька швидкість метаболізму метанолу свідчить про відсутність специфічного ензиму його метаболізму. У дослідженнях Е. Navakoudis зі співавт. [44] швидкість метаболізму метанолу

автотрофною культурою *Scenedesmus obliquus* становила 1,5 мкг/мкл ОУК (об'єм ущільнених клітин) за годину [44]. Також дослідники виявили світлозалежний характер метаболізму метанолу у разі використання мутантів із відсутнім світлозбиральним комплексом другої фотосистеми (СЗК II). Такі клітини втрачали здатність метаболізувати екзогенний метанол. Очевидно відсутність СЗК II призводить до зменшення захоплення фотонів другою фотосистемою, знижується швидкість транспортування електронів у хлоропластах і утворення ендогенного  $H_2O_2$  у хлоропластному диханні (реакція Мелера). Відсутність  $H_2O_2$  сповільнює опосередкований каталазою метаболізм метанолу.

Отже, питання щодо участі кожного з можливих ензимів метаболізму метанолу у рослин залишається відкритим, оскільки наявні лише непрямі, фрагментарні дані стосовно реакції окислення метанолу до формальдегіду.

**Кон'югація метанолу.** Як донор метильних груп метанол бере участь у вторинному метаболізмі рослин безпосередньо і опосередковано [45]. Детальніше його участь у вторинному метаболізмі розглядається нижче, під час обговорення  $C_1$ -метаболізму. У ході ЯМР досліджень метаболізму  $^{13}C$ -метанолу клітинами клена було виявлено індукцію синтезу метил- $\beta$ -D-глюкопіранозиду. Утворення метил- $\beta$ -D-глюкопіранозиду після декількох годин експозиції з метанолом не потребувало участі форміат- або формальдегіддегідрогенази (S-гідроксиметилглутатіон:  $NAD(P)^+$  оксидоредуктаза EC 1.1.1.284, ФАДГ). Спостерігалось 100%-не насичення метил- $\beta$ -D-глюкопіранозиду міткою, що свідчить про те, що метильна група метил- $\beta$ -D-глюкопіранозиду утворюється безпосередньо з  $^{13}C$ -метанолу [43]. Фізіологічна роль активації синтезу осмотично активної речовини — метил- $\beta$ -D-глюкопіранозиду метанолом, полягає в захисті рослини від осмотичного стресу при зневодненні, дозволяючи утримувати воду всередині клітин. Однак не виключено, що метил- $\beta$ -D-глюкопіранозид є побічним продуктом кон'югації метанолу в процесі його детоксикації.

Дослідження профілю експресії генів арабідопсиса у відповідь на аплікацію листків метанолом у концентрації 10 об'ємних відсотків дозволило встановити активацію експресії родин генів, пов'язаних з детоксикацією ксенобіотиків, захисних генів, а також регуляторних, транскрипційних та відповідальних за вторинний метаболізм (синтез антоціанів

і флавоноїдів) [46]. Додавання метанолу зумовлює підвищення експресії генів ензимів детоксикації ксенобіотиків (родина P-450). Метанол стимулює експресію генів ензимів другої фази детоксикації ксенобіотиків (кон'югації) — двох протеїнів із глюкозилтрансферазною активністю, і одного гену, продуктом якого є, очевидно, глутатіонтрансфераза. Третя фаза — ізоляція кон'югатів, утворених у другій фазі, включає транспортування кон'югатів у тонопласт або за межі клітини. Родина АТР-азних трансмембранних протеїнів АВС-транспортерів експресується протягом всього періоду впливу метанолу. Інші транспортні протеїни активно експресуються в різні часові проміжки після дії метанолу. Збільшення рівня експресії генів транспортних і кон'югуючих протеїнів (у тому числі глюкозилтрансфераз) може свідчити про транспортування антоціанідинів або кон'югатів метанолу у вакуолі. Нозерн-блот аналіз не підтвердив стимуляцію чи інгібування експресії ФАДГ і глутатіонзалежної ФАДГ, що свідчить про те, що метанол не впливає на фолатнезалежні реакції  $C_1$ -метаболізму в листках арабідопсиса [46].

Таким чином, обприскування листків *Arabidopsis thaliana* 10%-им метанолом активує захисний шлях кон'югації метанолу з наступною ізоляцією кон'югатів у вакуолярному компартменті. Також метанол в цій концентрації спричинює перебудову метаболізму клітин через активацію експресії генів метанолчутливих ензимів, транскрипційних факторів і регуляторних сигналів, що загалом негативно впливає на ріст і фізіологічний стан клітин за нормальних умов [46].

**Метаболізм формальдегіду.** Для рослин характерний незначний пул формальдегіду від 0,1 до 1 мкмоль на грам вологої маси [47, 48]. Формальдегід утворюється під час окисного деметилування амінокислот [49] і декарбоксілювання гліоксилату [50]. Однак головним джерелом утворення формальдегіду в тканинах рослин є дисоціація 5,10-метилентетрагідрофолату (5,10-метилентетрагідрофолату) і окислення метанолу, що утворюється внаслідок дії пектинестерази [4]. Також формальдегід утворюється внаслідок P-450-залежної детоксикації ксенобіотиків [51]. Екзогенний формальдегід може включатися в метаболізм фотосинтезуючих тканин як джерело вуглецю. Частина формальдегіду оборотно приєднується до нуклеофілів — глутатіону (з утворенням S-гідроксиметилглутатіону), аргініну (з утво-

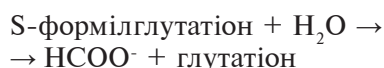
ренням N-гідроксиметиларгініну), аспарагіну (циклічний аддукт) і тетрагідрофолієвої кислоти (з утворенням 5,10-метилен-ТГФ), але аддуктів з тетрагідрофолієвою кислотою (ТГФ) утворюється мала кількість, оскільки пул ТГФ досить незначний [52].

Рослини, як і інші організми, містять глутатіонзалежну ФАДГ, яка окислює S-гідроксиметилглутатіон з утворенням тіоефіру S-формілглутатіону. Глутатіонзалежна ФАДГ каталізує реакцію:



Це конститутивний ензим із високим рівнем експресії і високим афінитетом до S-гідроксиметилглутатіону ( $K_m$  від 1,4 до 13 мкМ) [53, 54]. Він складається з двох однакових мономерів із молекулярною масою 42 кДа (ізоелектрична точка при рН 5,8). Ензим належить до III класу алкогольдегідрогеназ і, як згадувалось вище, є давньою формою алкогольдегідрогеназ рослин і мало відрізняється за первинною структурою в різних таксономічних групах живих організмів. Ген ФАДГ клонований і його продукт охарактеризований для арабідопсиса [53]. ФАДГ кодується одним геном, локалізованим у п'ятій хромосомі [55]. Були створені трансгенні лінії зі зниженим, або зі збільшеним вмістом ФАДГ для дослідження метаболізму екзогенного формальдегіду [56]. Збільшення концентрації ФАДГ супроводжувалось 25%-им зростанням швидкості детоксикації екзогенного формальдегіду. Було досліджено [57] токсичність і метаболізм  $^{13}\text{C}$ -формальдегіду рослинами. Швидкість метаболізму екзогенного формальдегіду листками тютюну становила 12,8 мкг/год·г вологої біомаси листка. Формальдегід у концентрації 2 мкл на літр газового середовища не спричинював швидких проявів фітотоксичності для багатьох рослин, але через декілька тижнів спостерігались осередки некрозу листків. Менші концентрації формальдегіду за тривалої експозиції зумовлюють затримку росту рослин без видимих патологічних змін.

Розщеплення S-формілглутатіону з утворенням форміату і глутатіону каталізує S-формілглутатіон гідролаза (ЕС 3.1.2.12), яка також конститутивно експресується і має високу спорідненість до S-формілглутатіону [45, 58].



Активність глутатіоннезалежної ФАДГ також виявлено в рослин.



Хроматографічне дослідження листових екстрактів *Chlorophytum comosum* показало, що глутатіоннезалежна ФАДГ – це протеїн з молекулярною масою 126 кДа [57]. Швидкість глутатіоннезалежного окислення формальдегіду становила від 2 до 6 нмоль/хв на 1 мг протеїну.

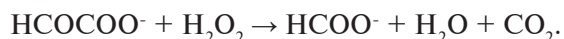
**Нітрозоглутатіонредуктазна активність ФАДГ.** Встановлено, що ФАДГ дуже активна у відновленні S-нітрозоглутатіону (GSNO) – продукту конденсації глутатіону і NO [59]. GSNO є природним депо NO і бере участь у підтриманні рівноваги S-нітрозилування протеїнів [59]. Було досліджено GSNO-редуктазну активність ФАДГ, одержаних з різних організмів, зокрема з арабідопсиса [60].

Результати останніх експериментів свідчать, що нітросполуки, такі як GSNO, відіграють ключову роль в NO сигнальній системі, модулюючи активність різних класів протеїнів шляхом S-нітрозилування в основному за одним критичним залишком цистеїну [61, 62]. NO виявляє свою токсичність лише за надлишку шляхом інгібування функцій протеїнів завдяки їхньому нітрозилуванню або опосередковуючи утворення пероксинітрилу [63]. Екзогенний GSNO активує захисну систему рослин проти патогенів.

Природа субстратів ФАДГ дозволяє стверджувати, що цей ензим відіграє важливу роль у захисті клітин проти різних типів стресу.

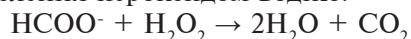
**Метаболізм форміату.** Як і метанол, форміат виділяється рослинами в атмосферу, але в меншій кількості [64]. В рослинах форміат утворюється за декарбоксілювання гліоксилату, внаслідок неензиматичної взаємодії формальдегіду з  $\text{H}_2\text{O}_2$  або пероксидазної активності каталази [65, 66]. В інших еукаріотичних організмів форміат утворюється під час дисоціації 10-форміл-ТГФ в мітохондріях [67]. Для хлоропластів бульб картоплі можливе обернення реакції окислення форміату форміатдегідрогеназою (форміат: NAD<sup>+</sup> оксидоредуктаза, ЕС 1.2.1.2, ФДГ), тобто, високий відновний потенціал мітохондрій забезпечує відновлення  $\text{CO}_2$  до форміату [68]. В анаеробних умовах *Chlamidomonas reinhardtii* здатна виділяти форміат у середовище культивування. Розщеплення пірувату з утворенням форміату і ацетил-СоА каталізує піруват-форміат ліаза (ЕС 2.3.1.54) [69].

Форміат утворюється в пероксисомах вищих рослин за декарбоксилювання гліоксилату (ГК) за участю каталази:



Реакція утворення форміату і виділення  $\text{CO}_2$  під час розчеплення міченого гліоксилату в ізольованих пероксисомах має оптимум рН 8–9 [70]. Додавання ізольованих хлоропластів або глюкозооксидази супроводжується збільшенням швидкості виділення  $\text{CO}_2$  і форміату в 3–4 рази. Для виявлення шляхів метаболізму форміату одержували чисті фракції органел шпинату і досліджували в них метаболізм  $^{13}\text{C}$ -форміату [71]. Значна активність окислення форміату характерна для фракцій хлоропластів і мітохондрій за рН 5, але вона незначна для фракції пероксисом. При рН 7 найактивніше метаболізували форміат мітохондріальна і пероксисомна фракції. Метаболізм форміату сильно сповільнювався інгібіторами каталази, такими як азид натрію, меркаптоетанол і аміотріазол. Додавання каталази до фракції хлоропластів супроводжувалось підвищенням метаболізму форміату. Екзогенний  $\text{H}_2\text{O}_2$  підвищував швидкість метаболізму форміату для фракції пероксисом і мітохондрій, але не хлоропластів. Внаслідок зменшення швидкості утворення  $\text{H}_2\text{O}_2$  в темряві метаболізм форміату хлоропластами пригнічувався. Каталазний шлях метаболізму насичувався форміатом при концентрації 0,1 мМ і рН 5. При концентрації форміату 10 мМ оптимум рН його метаболізму становив 6,0–6,5. Інгібітори  $\text{NAD}^+$ -залежної форміатдегідрогенази, такі як нітрати, АДФ-рибоза і  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , пригнічували метаболізм форміату за цих умов. Таким чином, у вищих рослин функціонують, принаймні, два шляхи окислення форміату:

1. Опосередкований каталазою шлях окислення пероксидом водню:



2.  $\text{NAD}^+$ -залежне окислення за участю ФДГ.



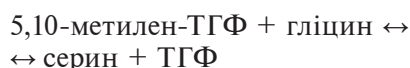
$\text{NAD}^+$ -залежна ФДГ каталізує окислення форміату до  $\text{CO}_2$  за спряженого відновлення  $\text{NAD}^+$  до  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . ФДГ складається із двох ідентичних субодиниць, не містить металів і простетичних груп і характеризується високою специфічністю як до форміату, так і до  $\text{NAD}^+$  [72]. У вищих рослин наявна лише  $\text{NAD}^+$ -залежна форміатдегідрогеназа, яка

локалізована в мітохондріальному матриксі [71, 73]. ФДГ в 5–8 разів поширеніша в мітохондріях бульб і пагонів порівняно з мітохондріями листків картоплі [73].

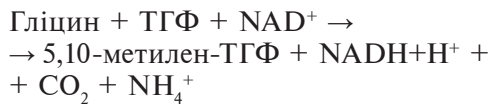
У деяких тканинах рослин, таких як запасаюча паренхіма бульб картоплі, ФДГ бере участь у диханні клітин, синтезуючи  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , у тому разі, коли цикл трикарбонних кислот його не забезпечує, наприклад, під час проростання бульб [74]. Інгібування сукцинатдегідрогенази малонатом спричинює зменшення мітохондріального дихання бульб лише на 10%. Під час проростання бульб малонатчутливе дихання з часом збільшується, тоді як малонатнезалежне не змінюється. Форміат – добрий субстрат для дихання ізольованих мітохондрій бульб картоплі, однак він інгібує окислення інших субстратів, таких як малат або сукцинат.

**Асиміляція формальдегіду і форміату в реакціях  $\text{C}_1$ -метаболізму і фотодихання.** Ензими окислення метанолу та його метаболітів, такі як глутатіонзалежна та незалежна ФАДГ, ФДГ, беруть участь у фолатнезалежних реакціях  $\text{C}_1$ -метаболізму. Формальдегід і форміат за конденсації з ТГФ беруть участь у фолатзалежних реакціях  $\text{C}_1$ -метаболізму рослин [75]. Автори цитованої роботи встановили, що біосинтез серину із гліцину або формальдегіду відбувається без утворення проміжних продуктів – гліоксилату чи форміату. Таким чином, вуглець від метанолу входить до метильних груп на рівні формальдегіду. Наявність у рослин 10-формілтетрагідрофолатсинтетази, вказує на те, що асиміляція метанолу відбувається також на рівні форміату.

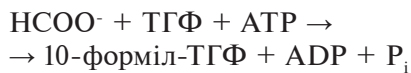
$\text{C}_1$ -метаболізм активний у тканинах рослин, котрі утворюють метильовані сполуки, такі як лігнін, алкалоїди і бетаїни. Потік вуглецю у  $\text{C}_1$ -метаболізмі відіграє ключову роль у фотодиханні під час перетворення дикарбонних кислот у трикарбонні. 5,10-Метилен-ТГФ належить до вільного пулу одновуглецевих сполук, що постійно використовуються в процесах синтезу нуклеотидів, хлорофілу, фосфадитилхоліну, компонентів клітинної стінки тощо. Серин і гліцин – два потенційні донори 5,10-метилен-ТГФ, рівновага між якими підтримується активністю серингідроксиметилтрансферази (ЕС 2.1.2.1), що локалізована в мітохондріях, пластидах і цитоплазмі [76]:



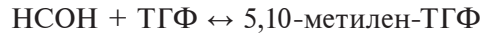
Ця біохімічна реакція є оборотною, і її напрямок визначається доступністю 5,10-метилен-ТГФ. На світлі, в циклі фотодихання постійно утворюється гліцин. Із гліцину в мітохондріях утворюється 5,10-метилен-ТГФ внаслідок чого серингідроксиметилтрансферазна реакція перебігає в напрямку синтезу серину. Гліциндекарбоксилазний комплекс (ЕС 1.4.4.2), локалізований в мітохондріях, каталізує окисне декарбоксилювання гліцину з утворенням 5,10-метилен-ТГФ [77].



Рослинні організми містять незначний пул форміату і швидко включають його в ТГФ-залежний C<sub>1</sub>-пул [78]. Активацію форміату каталізує 10-форміл-ТГФ синтетаза (ЕС 6.3.4.3), локалізована в пластидах, мітохондріях і цитоплазмі [79, 80].



Як згадувалося вище, формальдегід безпосередньо реагує з ТГФ, утворюючи 5,10-метилен-ТГФ.



10-Форміл-, 5,10-метеніл-, і 5-10-метилен-ТГФ взаємно перетворюються за участю ензиму – 5,10-метеніл-ТГФ циклогідролази/5,10-метилен-ТГФ дегідрогенази (ЕС 3.5.4.9). Цей NAD-залежний ензим також локалізований в органелах і цитоплазмі [81, 82].

<sup>13</sup>C-ЯМР дослідження полярних ліпідів [43], інкубованих з 5 мМ <sup>13</sup>C-міченого метанолу, дозволили виявити мітку у фосфатидилхоліні, фосфатидилсерині, фосфатидилінозитолі, фосфатидилгліцеролі, фосфатидилетаноламіні. Ці дані дозволяють стверджувати, що метаболізм метанолу в рослинних клітинах відбувається по C<sub>1</sub>-шляху. Тетрагідрофолієва кислота і S-аденозилметіонін відіграють ключову роль в реакціях трансметилування гомоцистеїну з утворенням метіоніну і в реакції метилування етаноламіну з утворенням холіну. У разі використання <sup>13</sup>C-міченого серину спостерігали подібний розподіл мітки в полярних ліпідах, тобто серин може замінити метанол у фолатзалежному C<sub>1</sub>-метаболізмі. У клітинах рослин більша частина вуглецю форміату проходить не через мітохондріальний форміатдегідрогеназний, а через 10-формілметіонін-синтетазний шлях. Клітини клена в дослідженнях E. Gout та ін.

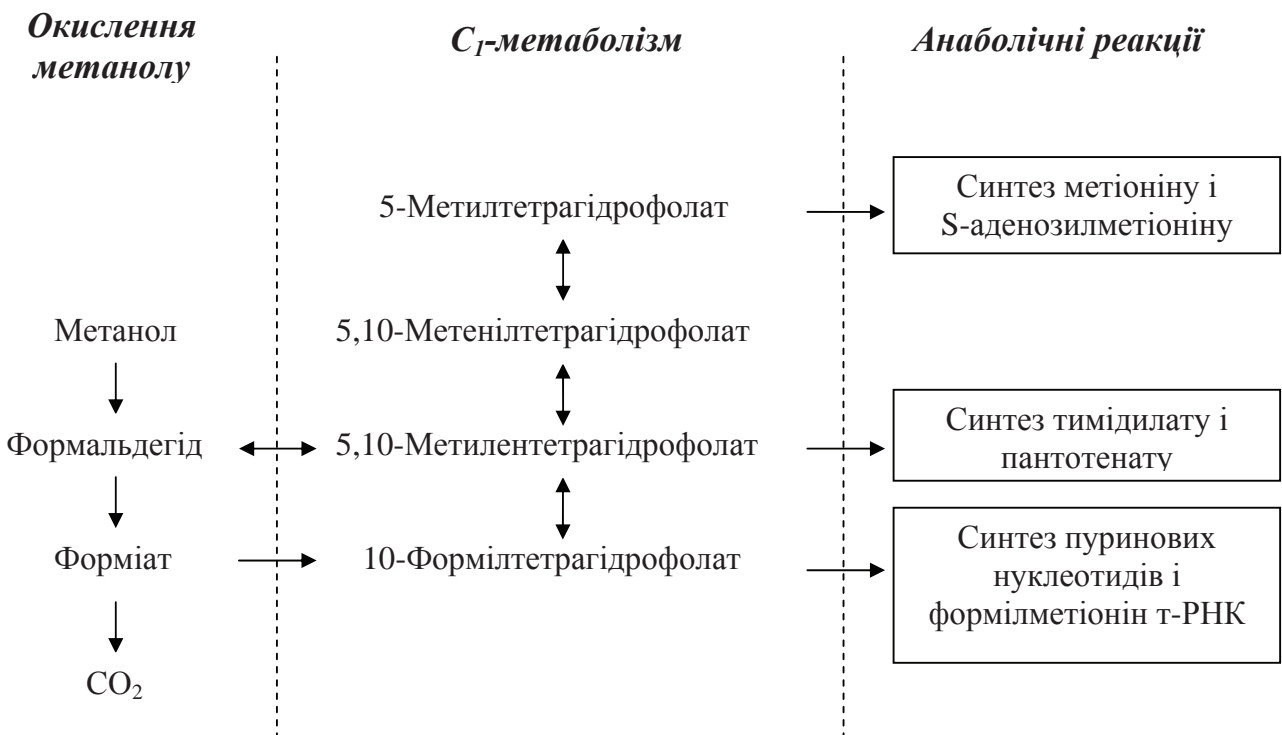


Рис. 3. Взаємозв'язок метаболізму метанолу з анаболічними реакціями C<sub>1</sub>-метаболізму (за з E. Gout, 2000) [43]



[43] метаболізують метанол (0,2 нмоль/год-г вологої біомаси) повільніше, ніж форміат (1 нмоль/год-г вологої біомаси). Низька спорідненість форміатдегідрогенази до субстрату ( $K_m$  форміату 1,7 мМ [71]) на відміну від 10-формілтетрагідрофолат синтетази ( $K_m$  форміату 35 мкМ [1]), може пояснити те, чому частина форміату, що утворюється під час метаболізму метанолу, вступає в  $C_1$ -метаболізм. У рослин і тварин є подібні метаболічні системи детоксикації формальдегіду, які забезпечують толерантність до мілімолярних його концентрацій. Проте, тваринний організм повільніше утилізує форміат, ніж рослинний і виділяє більшу його частину в незмінному вигляді [83].

Рослини здатні синтезувати гліюксилат у процесі тетрагідрофолатзалежної конденсації двох молекул форміату. Ензим гліюксилатсинтетаза було виділено і охарактеризовано із хлоропластів бульб картоплі [9, 66].

Таким чином, у рослин є повний набір ензимів для асиміляції метаболітів метанолу. Формальдегід і форміат за конденсації з ТГФ-кислотою використовуються в анаболічних реакціях  $C_1$ -метаболізму і фотодихання.

**Перспективи використання метанолу.** Завдяки особливостям метаболізму рослин в ході фотосинтезу, вуглець метанолу здатний входити до складу органічних речовин. Метанол також виконує роль сигнальної молекули, беручи участь у формуванні відповіді рослин на стрес [31]. Тому для підвищення врожайності рослин за допомогою екзогенного метанолу потрібно підбирати таку його концентрацію, при якій анаболічний ефект переважатиме його токсичний вплив. У 1999 році американські дослідники отримали патент на застосування метанолу для підвищення продуктивності рослин. Авторам вдалося досягти стимуляції росту  $C_3$ -рослин шляхом підбору оптимальної комбінації концентрації метанолу і джерел мінерального живлення.

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПУТЬ МЕТАНОЛА В РАСТЕНИЯХ

С. С. Степанов, Е. К. Золотарева

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного  
НАН Украины, Киев;  
e-mail: serhiy1986@ukr.net

В обзоре обсуждается метаболизм метилового спирта в растениях. Охарактеризованы энзимы последовательного окисления метанола и энзимы, обеспечивающие

включение углерода молекулы метанола в метильные группы фосфолипидов, карбоновых кислот и углеводов. Особенность растительных организмов заключается во взаимодействии реакций превращения метанола с фотодыханием и  $C_1$ -метаболизмом, в способности использовать углерод метанола для образования органических веществ в процессе фотосинтеза. Включение метаболитов метанола в анаболические процессы происходит на уровне формальдегида и формиата. В результате экзогенный метанол в невысоких концентрациях способен стимулировать фотосинтетическую продуктивность растений.

**Ключевые слова:** метанол, формиат, фотосинтетическая продуктивность, фотодыхание,  $C_1$ -метаболизм.

## METHANOL METABOLISM IN PLANTS

S. S. Stepanov, E. K. Zolotareva

Kholodny Institute of Botany, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: serhiy1986@ukr.net

### Summary

Methabolism of methanol in plant organisms is considered in the paper. Enzymes of consecutive oxidation of methanol and enzymes responsible for incorporation of carbon from methanol molecule to methyl groups of phospholipids, carboxylic acids and carbohydrates have been described. The peculiarity of plant organisms is in interaction of reactions of methanol transformation with pathways of photorespiration and  $C_1$ -metabolism and in the capacity to use methanol carbon to form organic matter through photosynthesis. The inclusion of methanol metabolites in anabolic processes occurs at the level of formaldehyde and formiate. As a result, exogenous methanol at low concentrations can stimulate the photosynthetic efficiency of plants.

**Key words:** methanol, formiat, photosynthetic productivity, photorespiration,  $C_1$ -methabolism.

1. Theodoridou A., Dörnemann D., Kotzabasis K. // Biochim. Biophys. Acta — 2002. — **1573**, N 2. — P. 189–198.
2. Zbiec I., Karczmarczyk S., Podsiado C. // Elec. J. Polish Agric. Univ. Agron. — 2003. — **6**. — P. 1–7.
3. Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sundaram S. P., Tongmin S. // Environ. Exp. Bot. — 2006. — **57**. — P. 168–176.

4. Fall R., Benson A. // Trends Plant Sci. – 1996. – **1**, N 9. – P. 296–301.
5. Mauney J. R., Gerik T. J. // Natl. Cotton Council Amer. – 1994. – **1**. – P. 39–40.
6. McGiffen M., Mantley J. // Hortic. Sci. – 1996. – **31**. – P. 1092–1096.
7. Nonomura A., Benson A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – **89**, N 20. – P. 9794–9798.
8. Степанов С. С., Золотарева Е. К. // Альгология. – 2011. – **21**, № 2. – С. 178–190.
9. Jones J., Bellion E. // J. Biochem. – 1991. – **280**. – P. 475–481.
10. Jacob D. J., Field B. D., Li Q. et al. // J. Geophys. Res. – 2005. – **110**. – D08303, doi:10.1029/2004JD005172.
11. Tie X., Guenther A., Holland E. // Ibid. – 2003. – **30**, N 17. – 1881. – doi:10.1029/2003GL017167.
12. Heikes B. G., Chang W., Pilson M. E. Q. et al. // Glob. Biogeochem. Cycles. – 2002. – **16**, N 4. – 1133. – doi:10.1029/2002GB001894.
13. Galbally I. E., Kirstine W. // J. Atmos. Chem. – 2002. – **43**. – P. 195–229.
14. Isidorov V. A., Zenkevich I. G., Ioffe B. V. // Atmos. Environ. – 1985. – **19**, N 1. – P. 1–8.
15. MacDonald R. C., Fall R. // Ibid. – 1993. – **11**. – P. 1709–1713.
16. Fukui Y., Doskey P. V. // J. Geophys. Res. – 1998. – **103**(D11). – P. 13153–13168.
17. von Dahl C., Schlogl R., Baldwin I. T. // Plant J. – 2006. – **46**. – P. 948–960.
18. De Gouw J. A., Howard C. J., Custer T. G. et al. // Geophys. Res. Lett. – 1999. – **26**, N 7. – P. 811–814.
19. Warneke C., Luxembourg S. L., de Gouw J. A. et al. // J. Geophys. Res. – 2002. – **107**(D8). – 4067. – doi:10.1029/2001JD000594.
20. Karl T., Harley P., Guenther A. et al. // Atmos. Chem. Phys. – 2005. – **5**. – P. 3015–3031.
21. Loreto F., Barta C., Brilli F., Nogues I. // Plant Cell Environ. – 2006. – **29**. – P. 1820–1828.
22. Holzinger R., Warneke C., Jordan A. et al. // Geophys. Res. Lett. – 1999. – **26**, N 8. – P. 1161–1164.
23. Frenkel C., Peters J. S., Tieman D. M. et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**, N 8. – P. 4293–4295.
24. Brunner A., Ammann C., Neftel A., Spirig C. // Biogeosci. Discuss. – 2007. – **4**. – P. 125–164.
25. Nemecek-Marshall M., MacDonald R. C., Franzen J. J. et al. // Plant Physiol. – 1995. – **108**. – P. 1359–1368.
26. O'Neill N., Albersheim P., Darvill A. / In Methods in Plant Biochemistry (Vol. 2), London: Academic Press; 1990. – P. 415–441.
27. Pelloux J., Rusterucci C., Mellerowicz E. J. // Trends Plant Sci. – 2007. – **12**, N 6. – P. 267–277.
28. Lionetti V., Raiola A., Camardella L. et al. // Plant Physiol. – 2007. – **143**. – P. 1871–1880.
29. Divol F., Vilaine F., Thibivilliers S. et al. // Plant Mol. Biol. – 2005. – **57**. – P. 517–540.
30. Giri A. P. et al. // Plant Physiol. – 2006. – **142**. – P. 1621–1641.
31. von Dahl C. C., Havecker M., Schlogl R., Baldwin I. T. // Plant J. – 2006. – **46**. – P. 948–960.
32. Downie A., Miyazaki S., Bohnert H. et al. // Phytochemistry. – 2004. – **65**. – P. 2305–2316.
33. Mason R. P., Sanders M., Gidley M. J. // Ibid. – 1986. – **25**. – P. 1567–1571.
34. Dolferus R., Jacobs M., Peacock W. J., Dennis E. S. // Plant Physiol. – 1994. – **105**. – P. 1075–1087.
35. de Bruxelles C. L., Peacock W. J., Dennis E. S., Dolferus R. // Ibid. – 2006. – **111**. – P. 381–391.
36. Schindler U., Menkens A. E., Beckman H. et al. // EMBO J. – 1992. – **11**. – P. 1261–1273.
37. Schulze-Lefert P., Dangel J., Becker-André M. et al. // Ibid. – 1989. – **8**. – P. 651–656.
38. Hazeu W., de Bruyn J. C., Bos P. // Arch. Microbiol. – 1972. – **87**. – P. 185–188.
39. Shen C. H., Yeh K. W. // J. Plant Physiol. – 2010. – **167**. – P. 400–407.
40. Мірошніченко О. С. // Біополімери і клітина. – 1992. – **8**, № 6. – С. 59–81.
41. Harris E. H. / The Chlamydomonas Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes. – Academic Press Inc, Canada. – 2009. – P. 271–275.
42. Yamaguchi J., Nishimura M., Akazawa T. // Eur. J. Biochemistry. – 1986. – **159**, N 2. – P. 315–322.
43. Gout E., Aubert S., Bligny R. et al. // Plant Physiol. – 2000. – **123**. – P. 287–296.
44. Navakoudis E., Ioannidis N. E., Dörnemann D., Kotzabasis K. // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – **1767**. – P. 948–955.
45. Hanson A. D., Roje S. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – **52**. – P. 119–137.
46. Olson B. J., Skavdahl M., Ramberg H. et al. // Plant Sci. – 2000. – **159**. – P. 205–212.
47. Blunden G., Carpenter B. G., Adrian-Romero M. et al. // Acta Biol. Hung. – 1998. – **49**. – P. 39–46.
48. Trezl L., Hullan L., Szarvas T. et al. // Ibid. – P. 253–263.
49. Sardi E., Tyihak E. // Biomed. Chromatogr. – 1994. – **8**. – P. 313–314.

50. Prather C. W., Sisler E. C. // *Phytochemistry*. – 1972. – **11**. – P. 1637–1647.
51. Clejan L. A., Cederbaum A. I. // *Biochem. J.* – 1993. – **295**. – P. 781–786.
52. Chen L., Chan S. Y., Cossins E. A. // *Plant Physiol.* – 1997. – **115**. – P. 299–309.
53. Martinez M. C., Achkor H., Persson B. et al. // *Eur. J. Biochem.* – 1996. – **241**. – P. 849–857.
54. Shafqat J., El-Ahmad M., Danielsson O. et al. // *Ibid.* – **236**. – P. 571–578.
55. Dolferus R., Osterman J. C., Peacock W. J., Dennis E. S. // *Genetics*. – 1997. – **146**. – P. 1131–1141.
56. Achkor H., Diaz M., Fernandez M. R. et al. // *Plant Physiol.* – 2003. – **132**. – P. 2248–2255.
57. Giese M., Bauer-Doranth U., Langebartels C., Sandermann H. J. // *Ibid.* – 1994. – **104**. – P. 1301–1309.
58. Uotila L., Koivusalo M. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1979. – **196**. – P. 33–45.
59. Liu L., Hausladen A., Zeng M. et al. // *Nature*. – 2001. – **410**. – P. 490–494.
60. Sakamoto A., Uedab M., Morikawa H. // *FEBS Letters*. – 2002. – **515**. – P. 20–24.
61. Stamler J. S., Lamas S., Fang F. C. // *Cell*. – 2001. – **106**. – P. 675–683.
62. Hess D. T., Matsumoto A., Nudelman R., Stamler J. S. // *Nat. Cell Biol.* – 2001. – **3**. – P. 1–3.
63. John G., Brot N., Ruan J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – **98**. – P. 9901–9906.
64. Gabriel R., Schafer L., Gerlach C. et al. // *Atmos. Environ.* – 1999. – **33**. – P. 1347–1355.
65. Brisson L. F., Zelitch I., Havir E. A. // *Plant Physiol.* – 1998. – **116**. – P. 259–269.
66. Havir E. A., McHale N. A. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1990. – **283**. – P. 491–495.
67. Applig D. R. // *FASEB J.* – 1991. – **5**. – P. 2645–2651.
68. Baack R. D., Markwell J., Herman P. L., Osterman J. C. // *J. Plant Physiol.* – 2003. – **160**. – P. 445–450.
69. Hemschemeier A., Jacobs J., Happe T. // *Eukaryot. Cell*. – 2008. – **7**, N 3. – P. 518–526.
70. Grodzinski B. // *Plant Physiol.* – 1979. – **63**. – P. 289–293.
71. Halliwell B. // *Biochem. J.* – 1974. – **138**. – P. 77–85.
72. Тишков В. И., Попов В. О. // *Биохимия*. – 2004. – **69**, № 11. – С. 1537–1554.
73. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Small I. D., Remy R. // *Plant Physiol.* – 1993. – **102**, N 4. – P. 1171–1177.
74. Hourton-Cabassa C., Ambard-Bretteville F., Moreau F. et al. // *Ibid.* – 1998. – **116**. – P. 627–635.
75. Cossins R. // *Can. J. Biochem.* – 1964. – **44**. – P. 1739–1802.
76. Besson V., Neuburger M., Rebeille F., Douce R. // *Plant Physiol. Biochem.* – 1995. – **33**. – P. 665–673.
77. Oliver D. J. // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1994. – **45**. – P. 323–337.
78. Prabhu V., Chatson K. B., Abrams G. D., King J. // *Plant Physiol.* – 1996. – **112**. – P. 207–216.
79. Chen L., Chan S. Y., Cossins E. A. // *Ibid.* – 1997. – **115**. – P. 299–309.
80. Kirk C. D., Chen L. F., Imeson H. C., Cossins E. A. // *Phytochemistry*. – 1995. – **39**. – P. 1309–1317.
81. Roje S., Wang H., McNeil S. D. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**. – P. 36089–36096.
82. Janave M. T., Ramaswamy N. K., Nair P. M. // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – **214**. – P. 889–896.
83. Дмитренко Н. П., Холиан А. // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 1. – С. 22–31.

Отримано 04.03.2011