

КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

на правах рукопису

МАКАРЕНКО
Ольга Анатоліївна

УДК 581.19:577.156

ВІЛИВ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ПРОТЕОЛІЗ
У ЗЕЛЕНИХ ПРОРОСТКАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ.

03.00.04 - біохімія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1994

AB 29971

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в лабораторії біохімії рослин Селекційно-генетичного інституту (м. Одеса) та в лабораторії біохімії Одеського біотехнологічного інституту в 1988 - 1993 роках.

Наукові керівники: доктор біологічних наук
ВОВЧУК Сергій Володимирович,

доктор біологічних наук,
професор, чл. - кор. УААН
ЛЕВИЦЬКИЙ Анатолій Павлович.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор СУДЬІНА Олена Григорівна,

кандидат біологічних наук,
науковий співробітник
ПОГОРІЛА Ніна Федорівна.

Провідна організація: Дніпропетровський державний університет

Захист відбудеться 13 квітня 1994 р. о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.01.07 для захисту дисертацій на біологічному факультеті Київського університету ім. Тараса Шевченка за адресою: 252601, м. Київ 17, вул. Володимирська, 64.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці університету

Автореферат розіслано "12" березня 1994 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук, професор

Брайон О. В.

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00810522 (1)

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Внутрішньоклітинний протеоліз є важливим механізмом регуляції обміну білків, оскільки накопичення і компонентний вміст білків визначається не тільки швидкістю їх біосинтезу, але і величиною деградації, що залежить від активності пептидгідролаз (КФ 3.4.), які знайдено в зерні і різних вегетативних органах рослин, в тому числі і листках злакових культур [Левицький, 1982; Mikla, 1986].

Особливо велике значення процеси протеолізу мають при адаптації рослинної клітини до несприятливих умов навколишнього середовища. Така адаптація включає не тільки синтез нових білків, відповідних зміненим потребам клітини, але і розпад, і виведення тих білків, які не потрібні для її нормального функціонування.

Однак, характер зміни активності пептидгідролаз і механізм, що регулює внутрішньоклітинний протеоліз при адаптації до несприятливого впливу вивчені недостатньо. Значною мірою це відноситься до формування стійкості рослин до низьких температур.

Морози та заморозки завдають економічних збитків, викликаючи зрідження посівів озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.). Тому вивчення фізіологічних і біохімічних процесів при адаптації озмих до низьких температур є важливим для виведення пристосованих до холоду сортів, що має велике значення для сільського господарства і виробництва продуктів харчування.

Мета і основні завдання дослідження. У відповідності з вищевикладеним, метою роботи є вивчення активності пептидгідролаз зелених проростків озимої пшениці у зв'язку з можливою участю даних ферментів у процесах криоадаптації та використання показників їх активності в селекції на морозостійкість.

В задачі дослідження входило вивчення у проростках пшениці при дії низьких температур

- сортових особливостей зміни активності різних груп пептидгідролаз;
- взаємозв'язку між активністю пептидгідролаз та білковим обміном;
- основних механізмів регуляції активності пептидгідролаз;
- дослідження біологічних властивостей проростків пшениці, що зазнали впливу низьких температур.

Наукова новизна роботи. Встановлено, що активність вивчених пептидгідролаз у не підданих холододовому впливу проростках пшениці,

високоморозостійких сортів достовірно нижча відповідних показників у проростках середньо- і слабоморозостійких сортів.

Показано сортові відмінності в зміні активності нейтральних протеїназ та карбоксипептидази у проростках пшениці при дії низьких температур.

Вперше встановлено, що більш висока карбоксипептидазна активність у міжклітинній рідині характерна для проростків високоморозостійких сортів у порівнянні з середньо- і слабоморозостійкими.

Показано, що основна кількість проліну, утворена в проростках високоморозостійких сортів при дії низької температури, накопичується у міжклітинному просторі.

Встановлено, що механізм активації нейтральних протеїназ і карбоксипептидази у проростках пшениці при холодовому загартуванні відбувається за рахунок підвищення активності вільних пептидгідролаз і не міняє вмісту зв'язаних форм ферментів.

У проростках пшениці вперше знайдено активатор карбоксипептидаз, що відкриває перспективи у вивченні механізмів внутріклітинного протеслізу у тканинах рослин та тварин.

Практичне значення роботи. Розроблено метод визначення морозостійкості сортів озимої пшениці за показником активності пептидгідролаз у вихідних, не підданих холодсовому впливу, проростках.

Запропоновано метод оцінки ступеня морозостійкості сортів озимої пшениці за показником активності нейтральних протеїназ та карбоксипептидази у проростках, підданих впливу низької температури.

На основі досліджень біологічних властивостей проростків пшениці, підданих впливу холоду, запропоновано новий біостимулятор з широким спектром дії "Біотріт".

На основі препарату з зелених проростків пшениці розроблено спосіб вирощування хлібопекарних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що значно підвищує вихід та якість товарної продукції (заявка на винахід N В 3301551).

На захист виносяться такі положення:

1. В процесі загартування відбувається зміна активності пептидгідролаз у проростках озимої пшениці, що можна розглядати як один з механізмів адаптації рослин до дії низьких температур.
2. Підвищення активності нейтральних протеїназ і карбоксипептидази при дії низьких температур у проростках пшениці корелює з накопиченням водорозчинних білків і вільних амінокислот.

3. Підвищення активності нейтральних протеїназ і карбокси-пептидази в проростках пшениці при холодовому загартуванні відбувається за рахунок збільшення активності вільних форм ферментів.

4. Одним з факторів регулювання внутрішньоклітинного протеолізу є низькомолекулярний активатор карбоксипептидаз, який вперше знайдено у проростках пшениці.

5. Процес адаптації озимої пшениці до холоду супроводжується підвищенням активності пептидгідролаз в міжклітинній рідині, а також накопиченням у міжклітинниках вільних амінокислот.

6. Адаптація до низькотемпературної дії призводить до накопичення у проростках пшениці біологічно активних речовин, що дозволяє запропонувати новий біостимулятор з широким спектром дії.

Апробація роботи. Основні положення дисертаційної роботи було викладено на науково-техничній конференції молодих вчених у 1991 році (м. Одеса, Селекційно-генетичний інститут), на засіданні Одеського відділення товариства біохіміків у 1992 році.

Публікації. Результати дисертації опубліковано в 5 працях.

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літературних даних, опису об'єктів і методів дослідження, результатів власних досліджень та їх обговорення (4 розділи), заключення, висновків, списку літератури і додатків. Роботу викладено на 109 сторінках машинописного тексту, наведено 14 таблиць і 12 малюнків. Список літератури містить 164 джерела (серед них 101 публікація зарубіжних авторів).

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Дослідження були проведені на надземній частині проростків шести індикаторних сортів озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), які відрізняються за ступенем морозостійкості: Одеська 16, Ульянівка (високоморозостійкі); Безоста 1, Обрій (середньоморозостійкі); Сан-Пасторе і Русалка (слабоморозостійкі). Тижневі проростки, вирощені в кліматичній шафі ВКШ - 73 при температурі вдень +22, вночі +18°C і тривалості дня 18 годин, піддавали дії температури +2°C при цілодобовому освітленні на протязі 10 діб (перша фаза загартування), а потім послідовній дії негативних температур -2, -4, -6°C (друга фаза загартування) в темряві на протязі 2 діб на кожний температурний режим.

Міжклітинну рідину одержували із шойноарганих проростків шляхом їх вакуумної інфільтрації на холоді при залишковому тиску

20 кПа в 50 мМ трис-НСl буфері рН 8,0 з наступним центрифугуванням [Valk, Loon, 1988].

Екстракцію вільних форм ферментів проводили із ліофілізованих і подрібнених проростків 0,2 М NaCl на протязі 30 хвилин при температурі +4°C. Гомогенат центрифугували при 6 000 об/хв, температурі +4°C на протязі 15 хвилин. В надосадовій рідині визначали активність пептидгідролаз за гідролізом козеїну при рН 6,0 (нейтральні протеїнази), гемоглобіну при рН 3,5 (кислі протеїнази), синтетичного субстрату N - α - бензоїл-DL-аргінін-4-нітроаніліну (БАПАази) [Вовчук, 1979]. Активність карбоксипептидази визначали за гідролізом синтетичного субстрату Kba-1-фенілаланін-1-аланіну [Visuri et al., 1969].

Активність ферментів виражали в нанокаталах (для нейтральних і кислих протеїназ), мікрокаталах (для БАПАази) і мілікаталах (для карбоксипептидази) на 1 кг ліофілізованої маси проростків. За 1 хв приймали кількість ферменту, що каталізує утворення 1 М тирозину (для нейтральних та кислих протеїназ) або 1 М аланіну (для карбоксипептидази), розщеплення 1 М субстрату (для БАПАази) за 1 с інкубації.

Активність зв'язаних (неекстракційних) пептидгідролаз визначали в ліофілізованих осадах після солової екстракції ферментів. В цьому випадку до наважки осаду додається розчин субстрату і кладеться на інкубацію при постійному струшуванні. Після інкубації реакцію зупиняли 10 % ТХУ (при визначенні активності нейтральних протеїназ) або кип'ятінням з подальшим центрифугуванням (при визначенні активності карбоксипептидази). Про активність зв'язаних форм пептидгідролаз судили по збільшенню в надосадовій рідині продуктів гідролізу.

Вільні амінокислоти одержували з ліофілізованих проростків 5% ТХУ. Легкорозчинні білки екстрагували з проростків водою. Білок визначали за методом Кьельдаля на аналізаторі білку "Kjeltec Auto 1030" (Швеція), а також колориметричним методом Лоурі або спектрофотометрично за поглинанням при 280 нм.

Колоничну хроматографію білків та поліпептидів проводили методом гель-фільтрації на обладнанні фірми LKB (Швеція), використовуючи сефадекси G-10, G-15, G-75. Амінокислотний аналіз білків і вільних амінокислот досліджували на автоматичному аналізаторі амінокислот "Hitachi - 835" (Японія).

Якісний аналіз цукрів проводили методом газо-рідинної хро-

маатографі на газовому хроматографі "Shimadzu GC-16A" (Японія). Кількісний вміст цукрів визначали антроновим методом, іонів калію - методом полум'яної фотометрії.

Для вивчення біологічних властивостей проростків пшениці готували водний екстракт у співвідношенні 1:50 шляхом кип'ятіння на протязі 5 хвилин, в якому в подальшому визначали рівень біологічної активності на дріжджовому тесті [Сисоєв, 1975], і адаптогенні якості: противиразкове при моделюванні стресових виразок шлунку у пацюків, радіопротекторне при гострому γ -опроміюванні мишей і антитоксичне на стрихніновому тесті [Соловйова, 1975].

Результати в таблицях і графіках подані у вигляді середніх арифметичних значень із трьох біологічних та трьох аналітичних повторностей для кожної пари сортів, що характеризуються однако-вим ступенем морозостійкості.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Вплив низьких температур на активність пептидгідролаз в проростках озимої пшениці. Вивчення пептидгідролаз показало, що зміна активності ферментів в проростках пшениці залежить від фази загартування рослин і значною мірою визначається рівнем морозостійкості сорту.

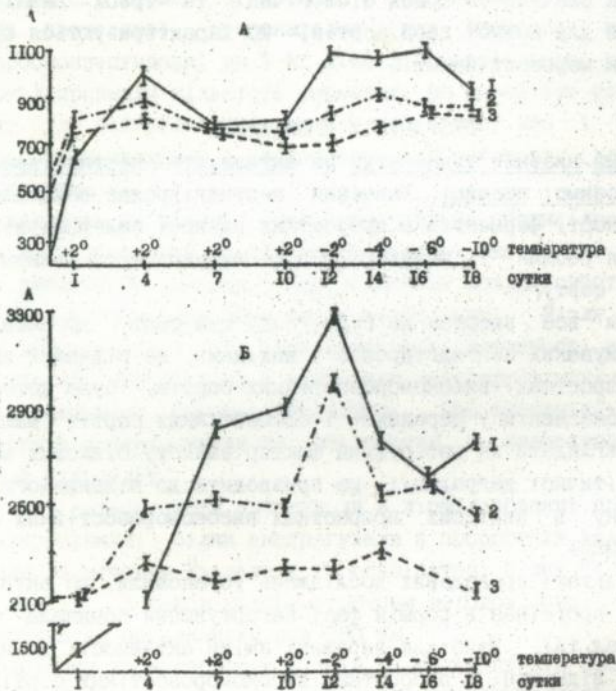
Перш за все звертає на себе увагу той факт, що активність всіх досліджуваних пептидгідролаз у вихідних, не підданих холодо-вій дії проростках високоморозостійких сортів, була достовірно нижча цих показників у середньо- і слабостійких сортів (мал. 1, 2). Це можна розглядати як своєрідний фактор захисту білкових молекул від протеолітичної деградації, що призводить до підвищеного накопичення білку в вихідних проростках високоморозостійких сортів [Джанумов, 1989].

В результаті проведених досліджень установили, що активність нейтральних протеїназ в першій фазі загартування починала збільшуватись (мал. 1А). Найбільш виражені зміни активності даних ферментів були відмічені в проростках високоморозостійких сортів, активність яких на четверту добу збільшувалася у 2 - 4 рази. Для середньо- і слабостійких сортів ці зміни носили набагато менш виражений характер. Другий підйом активності нейтральних протеїназ був відмічений при дії негативних температур.

Аналогічні сортові різниці спостерігали для карс ксипептидази (мал. 1Б), достовірно збільшення активності якої (в 2 - 2,5 ра-

зи на цьому добу першої фази) також було спостережено у морозостійких сортів. Але максимальних значень даний показник досягав у другій фазі при температурі -4°C . Менш виражене збільшення активності карбоксипептидази (в 1,5 рази) було відмічено у середньостійких сортів, в той час як у слабостійких рівень активності даного ферменту практично не змінювався.

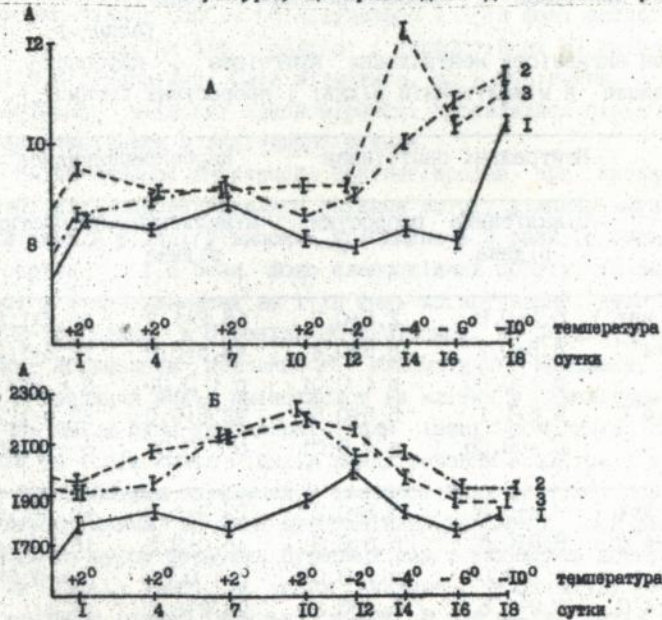
Таким чином, активність нейтральних протеїназ і карбоксипептидази чітко корелювала зі станом загартованості проростків і підвищувалась в більшій мірі у високоморозостійких сортів, що свідчить про адаптаційний характер збільшення активності цієї групи ферментів.



Мал. 1 Зміни активності нейтральних протеїназ (А) і карбоксипептидази (Б) в проростках пшениці при загартуванні. 1 - високостійкий, 2 - середньостійкий, 3 - слабостійкий сорти.

На відміну від нейтральних протеїназ і карбоксипептидази, активність БАПАази на всіх етапах загартування була достовірно нижча в проростках високоморозостійких сортів (мал. 2А).

А збільшення активності цього ферменту спостерігали тільки в період дії негативних температур. Для проростків високоморозостійких сортів характерна і більш низька активність кислих протеїназ (мал. 2Б). Висока активність БАПАази і кислих протеїназ в проростках слабостійких сортів на всіх етапах хłodового загартування свідчить про те, що дані ферменти можуть виконувати деструктивну роль в рослинній клітині, руйнуючи життєво важливі білки при дії низької температури, що призводить до загибелі рослини.



Мал. 2. Зміни активності БАПАази (А) і кислих протеїназ (Б) в проростках пшениці при загартуванні. 1 - високоморозостійкі, 2 - середньоморозостійкі, 3 - слабкоморозостійкі сорти.

2. Активність пептидгидролаз і компонентний склад міжклітинної рідини проростків пшениці при дії низьких температур. На сьогодні встановлено, що висока морозостійкість рослин досягається шляхом інтенсивного відтоку води з клітин в міжклітинники, а також шляхом накопичення низькомолекулярних речовин - кріопротек-

торів, що знижують точку замерзання клітин та міжклітинників [Туманов, 1979]. Тому в плані подальшого вивчення можливих біохімічних механізмів формування стійкості до низьких температур являє інтерес вивчення процесів протеолізу і компонентного складу міжклітинної рідини проростків пшениці. Оскільки активність нейтральних протеїназ і карбоксипептидази найбільш чітко корелює з загартованим станом проростків пшениці, в подальшому ми зупинились на вивченні тільки цих ферментів.

Проведені дослідження показали, що в міжклітинній рідині, одержаній з проростків різних сортів, було виявлено активність нейтральних протеїназ і карбоксипептидази (табл. 1).

Таблиця 1

Цітима активність нейтральних протеїназ і карбоксипептидази в міжклітинній рідині і проростках пшениці.

		Нейтральні протеїнази		Карбоксипептидаза	
		міжклітинна рідина	проростки	міжклітинна рідина	проростки
високо-стійкі сорти	вих. $+4^{\circ}\text{C}$	$6,5 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,2$	$16,2 \pm 1,7$	$11,5 \pm 1,2$
		$8,8 \pm 0,7$	$5,8 \pm 0,4$	$43,5 \pm 3,8$	$12,8 \pm 1,3$
		$p > 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p > 0,1$
середньо-стійкі сорти	вих. -4°C	$9,6 \pm 1,1$	$5,6 \pm 0,5$	$92,5 \pm 9,0$	$28,6 \pm 1,7$
		$p = 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,05$
слабо-стійкі сорти	вих. $+4^{\circ}\text{C}$	$7,9 \pm 0,6$	$3,5 \pm 0,2$	$23,3 \pm 1,9$	$19,3 \pm 1,8$
		$8,8 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,3$	$46,0 \pm 3,3$	$16,2 \pm 1,4$
		$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p > 0,05$
слабо-стійкі сорти	вих. -4°C	$6,9 \pm 0,6$	$5,1 \pm 0,2$	$98,2 \pm 8,4$	$18,3 \pm 1,9$
		$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p > 0,05$
слабо-стійкі сорти	вих. $+4^{\circ}\text{C}$	$9,8 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,1$	$34,6 \pm 3,7$	$15,8 \pm 1,2$
		$10,7 \pm 0,9$	$4,2 \pm 0,2$	$52,3 \pm 4,4$	$10,6 \pm 0,9$
		$p > 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$
слабо-стійкі сорти	вих. -4°C	$8,6 \pm 0,8$	$4,2 \pm 0,3$	$80,2 \pm 7,3$	$15,4 \pm 1,3$
		$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$

p - достовірність по відношенню до вихідної активності ферментів

При дії низьких температур питома активність нейтральних протеїназ міжклітинної рідини середньо- і слабостійких сортів змінювалася незначно, в той час як для високоморозостійких сортів цей показник збільшувався в 2-ій фазі загартування в 1,5 рази (при $p=0,05$).

Набагато більш виражені зміни спостерігали для карбоксипептидази, питома активність якої в міжклітинній рідині при адаптації пшениці до низьких температур різко збільшувалася. При цьому ступінь підвищення різний для сортів, що відрізнялися за морозостійкістю. Питома активність карбоксипептидази міжклітинної рідини високостійких сортів збільшувалася в 2-ій фазі загартування в 5,7 рази, тоді як для середньо- і слабостійких ці зміни склали 4,1 і 2,3 відповідно. Слід відмітити, що у порівнянні з цілісними проростками, виявлені закономірності проявлялися більш чітко для карбоксипептидази міжклітинної рідини.

Зміни питомої активності пептидгідролаз при низькотемпературній дії супроводжувалися змінами вмісту вільних амінокислот в міжклітинній рідині: у високо- приблизно в 2 рази, у середньостійких сортів - в 1,5 рази. Щодо слабостійких сортів, то вміст амінокислот в міжклітинниках на 1-ій фазі загартування дещо знизився, а на 2-ій різко (в 6 разів) збільшувався, що пояснюється скоріше всього порушенням проникності плазматичної мембрани, наслідком чого є пасивний вихід амінокислот із клітин у міжклітинники. Аналогічні зміни були характерні і для інших осмотиків клітини - цукрів та іонів калію: вихід даних речовин з клітин у міжклітинники був найбільш виражений у високостійких сортів у порівнянні з середньостійкими, що має адаптаційний характер, оскільки амінокислоти та цукри формують буферний шар і захищають поверхню плазмалемі [Тео, Ли, 1986], а також знижують температуру замерзання міжклітинної рідини [Стаценко, 1992]. В той же час витік осмотично активних речовин в міжклітинники проростків слабостійких сортів може відбуватися через інактивацію системи активного транспорту плазмалемі рослинної клітини [Палта, Ли, 1983].

При дії низьких температур в міжклітинному просторі проростків виростає вміст вільного проліну (табл. 2): у високо- а 2 до 35 %, у середньо- а 3 до 8 %, а у слабоморозостійких сортів підвищується незначно. Збільшення рівня проліну в міжклітинниках може бути пов'язане з підвищенням активності карбоксипептидази і гідролізом пролін-багатих білків.

Таблиця 2

Вміст вільного проліну в міжклітинній рідині проростків пшениці при дії низьких температур, % від суми амінокислот

	високостійкі сорти			середньостійкі сорти			слабостійкі сорти		
	вих.	+2°C	-4°C	вих.	+2°C	-4°C	вих.	+2°C	-4°C
Пролін	2,0	28,0	35,0	3,1	10,0	8,3	2,9	4,2	3,8

Різке зростання рівня проліну у міжклітинниках морозостійких сортів має адаптаційне значення, так як зі збільшенням концентрації проліну відносна в'язкість розчинів значно підвищується, що істотно зменшує температуру замерзання [Перуанський, 1981]. Механізм захисної дії проліну інші автори пояснюють збереженням нативного стану біополімерів [Стаценко, 1992].

Таким чином в процесі адаптації до низьких температур для проростків високостійких сортів є характерним підвищення в міжклітинній рідині питомої активності нейтральних протеїназ і карбоксипептидази, а також збільшення вмісту вільних амінокислот і, особливо, вільного проліну, що дозволяє розглядати підвищення позаклітинного протеолізу як один із можливих механізмів адаптації рослин до низьких температур.

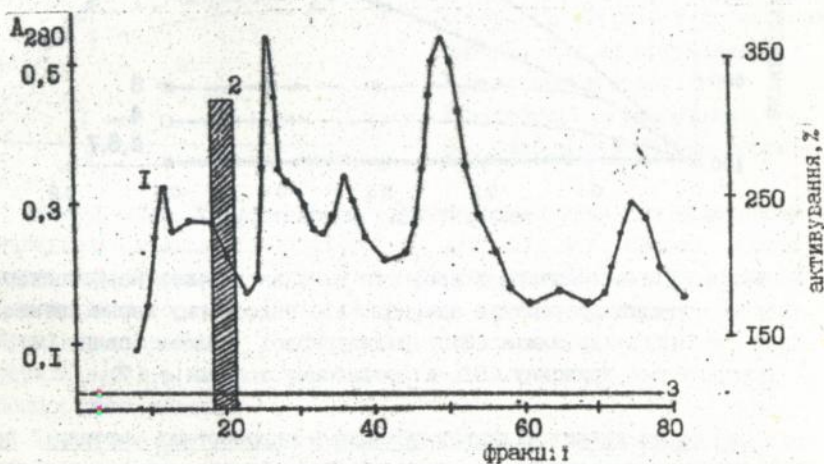
3. Можливі механізми регуляції протеолізу в проростках пшениці при дії низьких температур. Для в'яснення цього питання нами було вивчено активність вільних і зв'язаних форм пептидгідролаз. Проведені дослідження показали, що при низькотемпературній дії в проростках підвищувалася активність вільних форм нейтральних протеїназ і практично не змінювався рівень активності зв'язаних в клітинними структурами ферментів. При цьому для проростків високостійких сортів було характерно більш високе зростання активності вільних протеїназ.

Аналогічні дані були одержані і при вивченні вільних і зв'язаних форм карбоксипептидаз проростків пшениці при низькотемпературній дії. Таким чином, зростання активності нейтральних протеїназ і карбоксипептидази у проростках пшениці при дії низьких температур відбувається за рахунок підвищення активності вільних

пептидгідролаз. Одним з механізмів цього може бути підсилення синтезу даних ферментів: Schafer і Fischer [1988] показали, що деякі фракції білків, які синтезуються при дії холоду у листках томату, мають протеолітичну активність і по своїй природі є тіловими протеїназами.

Одним з найефективніших і специфічних механізмів регуляції протеолізу є регуляція активності ферментів інгібіторами білкової природи, дуже поширеними в рослинних і тваринних об'єктах. В зв'язку з цим досліджували вміст інгібіторів ендогенних пептидгідролаз в проростках взятих для вивчення сортів пшениці. Основні білкові фракції проростків були одержані за допомогою гель-фільтрації на сефадексі G-75 і рехроматографії на сефадексі G-15. При цьому в хроматографічних фракціях в концентрації після гель-фільтрації і співвідношенні фермент/фракція 1:1 не знайдено інгібіторів нейтральних протеїназ або карбоксипептидази (мал. 3).

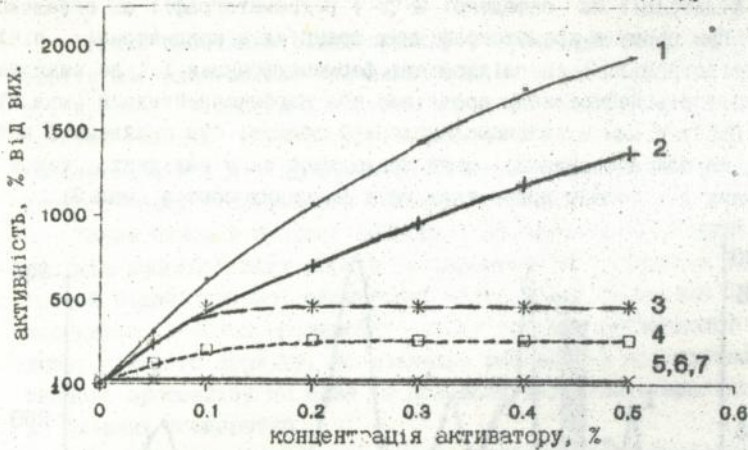
Поряд з цим в низькомолекулярній області був знайдений активатор карбоксипептидази, який знаходився як у вихідних, так і у підданих дії холоду проростках усіх вивчених сортів (мал. 3).



Мал. 3. Гель-фільтрація активатора карбоксипептидази на сефадексі G-15. Колонка 1,6 x 90 см; швидкість 9,0 мл/см². год; елюція 1 % NaCl; об'єм фракції 6 мл; нанесено 24 мг білку. 1 - білок, A ; 2 - активування карбоксипептидази, %; 3 - інгібування карбоксипептидази і нейтральних протеїназ, %.

Вивчення специфічності дії активатора по відношенню до карбоксипептидаз проростків пшениці показало, що активуюча дія даного модифікатора не залежала від рівня морозостійкості сорту і фази загартування. В проростках також не змінювався загальний вміст активатора при дії холоду.

Однак знайдений активатор значно підвищував активність карбоксипептидази ендосперму зерна пшениці і в меншій мірі - карбоксипептидази γ дріжджів і підшлункової залози свині. У той же час на активність таких ендопептидаз як трипсин, хімотрипсин і папаїн активатор практично не впливав (мал. 4). Ці результати свідчать, що модифікована дія активатора залежить не від природи активного центру, а від інших каталітичних властивостей пептидгідролаз.



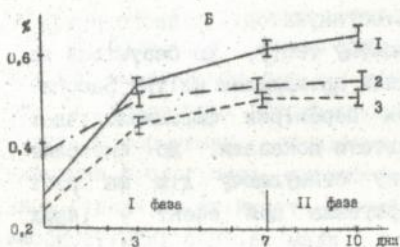
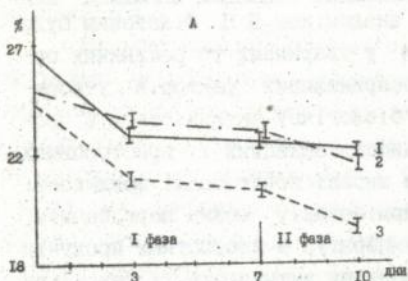
Мал. 4. Дія активатора з проростків на активність карбоксипептидаз проростків пшениці (1), ендосперму зерна пшениці (2), дріжджів (3), підшлункової залози свині (4), трипсину (5), хімотрипсину і папаїну (7).

4. Зміна деяких білкових фракцій в проростках пшениці при дії низьких температур. Оскільки об'єктом безпосередньої дії пептидгідролаз є білки, то зміна активності цієї групи ферментів тісно зв'язана з білковим метаболізмом.

Проведені дослідження різних по стійкості до морозу сортів показали, що при дії низької позитивної температури (+2°C) відбувалося значне зменшення загального вмісту білку, рівень якого про-

довжав знижуватись і при дії негативної температури (-6°C) (мал. 5А). Причому більш різке зменшення сумарної кількості білку відбувалося у слабостійких сортів пшениці.

Зміна вмісту водорозчинних білків проростків пшениці носила протилежний характер, тобто спостерігалось значне підвищення їх кількості на протяг першої фази і подальше збільшення при проходженні другої фази загартування (мал. 5Б). В даному випадку збільшення кількості водорозчинних білків більш яскраво було виражене у високостійких сортів, що свідчить про адаптаційний характер їх накопичення.



Мал. 5. Вміст загальних (А) і водорозчинних (Б) білків у проростках пшениці при загартуванні.
1 - високиморозостійкі,
2 - середньоморозостійкі,
3 - слабоморозостійкі сорти

Таким чином, деякі білки рослинної клітини при холодовому загартуванні піддаються деградації, причому цей процес носить адаптаційний характер, оскільки спостерігається і в проростках високостійких сортів. Певну роль при цьому можуть відігравати нейтральні протеїнази та карбоксипептидаза, активність яких зростала при дії низьких температур в більшій мірі в проростках високостійких сортів.

Більш значне зниження рівня сумарного білку в проростках слабостійких сортів може бути зв'язане з більш високою активністю кислих протеїназ і БАПАаз, що може стати причиною деструкції життєво важливих білків клітини і загибелі проростків цих сортів.

Загартування озимих рослин супроводжується змінами ряду біохімічних показників, що відображають їх адаптаційні здібності. До захисних механізмів слід віднести зростання рівня вільних ам.ло-

кислот [Стаценко, 1992]. Одною з причин такого накопичення може бути значне збільшення активності карбоксипептидази.

Таким чином, процеси реорганізації білкових молекул, деградації складних білків на більш прості, підвищення їх гідрофільності, накопичення вільних амінокислот в рослинних тканинах при дії низьких температур можуть регулюватися рівнем протеолізу.

5. Біологічні властивості проростків пшениці, підданих дії низьких температур. Ще у 1933 році академіком В. П. Філатовим було висунуто гіпотезу, згідно з якою у тваринних та рослинних організмах в процесі адаптації до несприятливих факторів утворюються речовини, які мають виражену біологічну активність і є продуктом активної функціональної діяльності захисних і пристосовних механізмів живих систем. Враховуючи широкі пристосовні можливості озимої пшениці, які генетично детерміновані, можна передбачити, що утворені при дії низьких температур в проростках продукти метаболізму будуть мати високу біологічну активність і загадну адаптогенну дію по відношенню до інших організмів.

Рівень біологічної активності біостимуляторів різнного походження чітко визначається по дріжджовому тесту, що базується на стимуляції цими препаратами розмноження дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae*, і є першим етапом перевірки фармакологічної дії біостимуляторів. Одержані результати показали, що екстракт проростків пшениці виявляв виражену стимулюючу дію на ріст дріжджів, яка в 2 - 4 рази перевершувала цей ефект у інших біостимуляторів (табл. 3).

Таблиця 3

Порівняльний вплив біостимуляторів на ріст дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, %

препарат	Біологічна активність
Контроль (фізрозчин)	100
Торфот	266 ± 18,9
Екстракт алое	535 ± 26,5
Екстракт плаценти	637 ± 41,3
Екстракт проростків пшениці	1140 ± 90,7

Дослідження по вивченню рівня біологічної активності екстрактів з проростків пшениці високоморозостійкого сорту Одеська 16, підданих різним строкам дії температури +4°C, показали, що по мірі дії холоду рівень біологічної активності проростків зростає і досягає максимальних значень на 5 - 7 добу низькотемпературного впливу. Аналогічні зміни були відмічені і для показника вмісту амінокислот.

Високий кореляційний зв'язок цих двох процесів підтвержує, що вільні амінокислоти, можливою причиною накопичення яких є підвищення активності пептидгідролаз, відіграють визначну роль у високому рівні біологічної активності проростків. Одержані результати узгоджуються з дослідями І.І. Чикало і А.В. Благовещенського [1975], які вважають що первинними біохімічними процесами при дії низької температури на біологічні об'єкти є переважання протеолізу і накопичення вільних амінокислот, а вторинним подальше перетворення цих амінокислот шляхом деамінування у карбонові кислоти, які є активними метаболітами.

Як було встановлено вище, процеси протеолізу і накопичення вільних амінокислот при дії холоду набагато інтенсивніше протікають у проростках високоморозостійких сортів пшениці і приймають участь у формуванні механізмів адаптації до цих умов. Порівняльне вивчення біологічної активності водних екстрактів проростків пшениці різних по стійкості до морозу сортів показало, що проростки високостійких сортів мали і більш високий рівень біологічної активності у процесі їх загартування.

Показник біологічної активності екстракту проростків пшениці на дріжджовому тесті настільки великий, що цей ефект можна використовувати у дріжджовому виробництві. Враховуючи цю обставину, нами був розроблений спосіб вирощування хлібопекарних дріжджів, оснований на введенні в культуральне середовище для росту дріжджів стимулятора із проростків, підданих дії холоду.

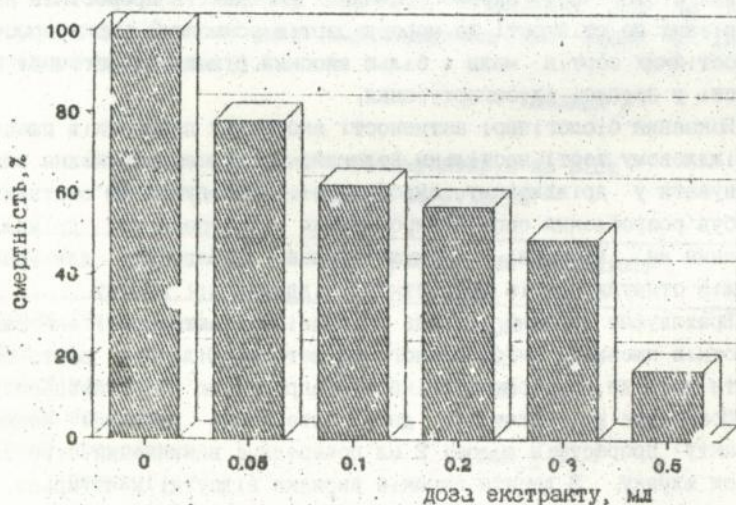
Враховуючи високий рівень біологічної активності екстракту проростків пшениці, виготовленого за методом Філатова, варто продовжити досліді по фармакологічному направленню цього препарату.

Попереднє на протязі 14 днів ентеральне введення пацокам екстракту проростків в дозі 2 мл попереджує виникнення стресових виразок шлунку. З десяти пацоків виразки відсутні у чотирьох, а площа ураження слизової шлунку при введенні препарату зменшується майже в 10 разів (табл. 4).

Вплив попереднього введення екстракту проростків пшениці на експериментальні виразки шлунку у білих пацюків.

Умови дослідів	Кількість пацюків з виразками	Загальна кількість виразок	Площа ураження, мм ²
контроль (n = 10)	10	13	22,0 ± 1,8
дослід (n = 1)	6	6	2,4 ± 0,5

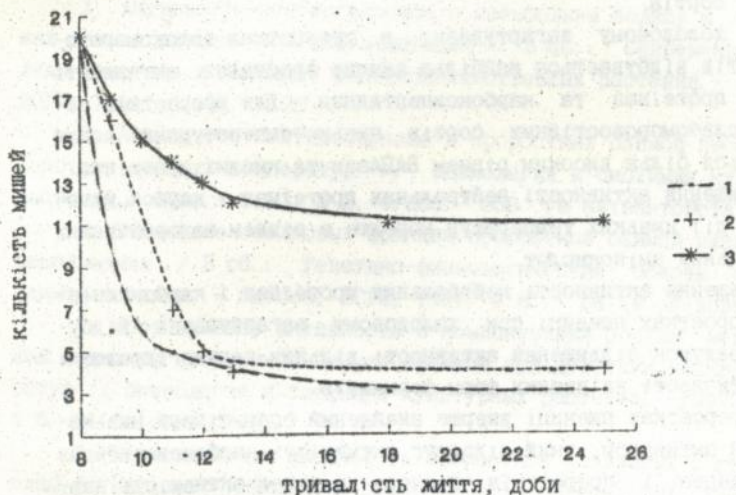
Антитоксичну дію екстракту проростків пшениці досліджували на стрихніновому тесті, який заснований на реєстрації проценту смертності білих мишей при введенні отруйної дози стрихніну на фоні попередніх ін'єкцій препарату, що вищастється, в різних дозах (мал. 6). З аналізу наведених даних випливає, що отруйна дія стрихніну знижувалася по мірі збільшення дози попередньо введеного екстракту проростків пшениці.



Мал. 6. Антитоксична дія екстракту проростків пшениці

Оцінка радіозахисної ефективності досліджуваного екстракту по середній тривалості життя мишей приведена на малюнку 7, з якого видно, що попереднє ентеральне введення препарату в дозі 0,2 мл мало виражений радіозахисний ефект: виживання тварин складало 55 % (у 5,5 рази вище ніж у контролі). При попередньому підшкірному введенні екстракту подібного ефекту не було виявлено.

Відомо, що іонізуюче випромінювання при дозі 1000 р і вище викликає в організмі кишечну форму променевої хвороби, при якій гине основна маса епітелію тонкої кишки. Можна думати, що попереднє ентеральне введення екстракту проростків підвищує резистентність насамперед слизової оболонки кишечника, що і приводить в кінцевому результаті до радіозахисного ефекту.



Мал. 7. Вплив попереднього введення екстракту проростків пшениці на виживання мишей при гострому γ -опроміненні: 1 - контроль; 2 - підшкірне введення екстракту; 3 - ентеральне введення екстракту.

Таким чином, проростки пшениці під впливом низьких температур накопичують метаболіти, що допомагають адаптації і виживанню рослин у змінних умовах. Певну роль при цьому можуть відігравати процеси протеолізу. Наші дослідження показали, що препарат, виготовлений з таких проростків, має високу біологічну активність з

чітко вираженою фармакологічною направленістю - здатністю стимулювати захисні системи організму. Попередні результати досліджень передані фармакологам для більш глибокого вивчення властивостей проростків пшениці з метою створення препарату - адаптогена під назвою "Біотріт". В сучасних екологічно несприятливих умовах життя людини та тварин пошук і застосування препаратів, стимулюючих захисні системи організму, є гостро актуальним і необхідним.

ВИСНОВКИ

1. Вихідні, не піддані дії холоду проростки високоморозостійких сортів пшениці характеризуються більш низьким рівнем активності пептидгідролаз у порівнянні з проростками середньо- і слабостійких сортів.

2. При холододовому загартуванні в проростках високоморозостійких сортів відбувається найбільш значне зростання активності нейтральних протеіназ та карбоксипептидази. Для проростків середньо- і слабкоморозостійких сортів низькотемпературний вплив супроводжується більш високим рівнем БАПАази та кислих протеіназ.

3. Підвищення активності нейтральних протеіназ і карбоксипептидази при дії низьких температур корелює з рівнем водорозчинних білків і вільних амінокислот.

4. Збільшення активності нейтральних протеіназ і карбоксипептидази в проростках пшениці при холододовому загартуванні відбувається за рахунок підвищення активності вільних пептидгідролаз і не міняє активності зв'язаних форм ферментів.

5. В проростках пшениці вперше знайдений специфічний низькомолекулярний активатор, який підвищує активність карбоксипептидаз ендосперму зерна і проростків пшениці, а також активність карбоксипептидази дріжджів та підшлункової залози свині.

6. При холододовому загартуванні в міжклітинній рідині проростків високоморозостійких сортів пшениці відбувається більш високе зростання питомої активності нейтральних протеіназ і карбоксипептидази у порівнянні з відповідними показниками у середньо- та слабкоморозостійких сортів.

7. Висока питома активність пептидгідролаз в міжклітинному просторі проростків морозостійких сортів при дії низьких температур супроводжується інтенсивним накопиченням вільних амінокислот і, особливо, вільного проліну.

8. Різке збільшення вмісту вільних амінокислот, цукрів та

іонів калію в міжклітинному просторі проростків слабостійких сортів пшениці при дії негативних температур вказує на порушення проникності плазмалемі в результаті інактивациі системи активного транспорту.

9. В підданих дії низької температури проростках пшениці накопичується комплекс біологічно активних речовин, які стимулюють ріст дріжджів.

10. Виявлено адаптогенні властивості водних екстрактів з проростків пшениці, підданих дії холоду, що дозволяє запропонувати новий біостимулятор з широким спектром дії.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ З ДИСЕРТАЦІЙНОЇ ТЕМИ

1. Активність пептидгідролаз и метаболізм белков в проростках озимой пшеницы при криоадаптациі // В сб.: Современные проблемы генетики и селекции сельскохозяйственных растений. - Одесса, ВСГи, 1991. - С. 132 - 133

2. Активність пептидгідролаз в проростках озимой пшеницы при действии низких температур // Физиология и биохимия культурных растений. - 1991. - Т. 23, N 2. - С. 355 - 358. (в співавторстві).

3. Изменение белковых фракций проростков озимой пшеницы при закаливании // В сб.: Генетико-физиологические основы селекции озимой пшеницы. - Одесса, ВСГи, 1991. - С. 81 - 86 (в співавторстві).

4. Протеиназная активность и компонентный состав межклеточной жидкости проростков озимой пшеницы при действии низких температур // Физиология и биохимия культурных растений. - 1993. - Т. 25, N 6. (в співавторстві).

5. Биологическая активность проростков различных сортов пшеницы // Науково - технічний бюлетень СГІ. - Одеса, СГІ, 1993. (в співавторстві).

Шванг

Полп. к печати 9.03.94г. Формат 60x84 I/I6.
Об'ем 0,8уч.изл.л. I,25п.л. Заказ№272. Тираж 100экз.
Гортилография Одесского управления по печати, цех№3.
Л нина 49.

462836

AB29971

AB 29.971