

ISSN: 2310-6255

Founder: Academic Publishing House *Researcher*

DOI: 10.13187/issn.2310-6255

Has been issued since 2013.



European Journal of Molecular Biotechnology

UDC 581.1:631.531.027.3:631.559:581.143

**Effect of Pulse Pressure Treatment on Content of Protein
and Some Sugars in Wheat Seeds**

¹Violetta Pavlova
²Ekaterina Vasichkina
³Sergey Belopuhov
⁴Alexey Kolotvin
⁵Vladimir Lysak

¹ Volgograd State Technical University, Russian Federation
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28
Post-graduate student

E-mail: Violetta_Mir@mail.ru

² Volgograd State Technical University, Russian Federation
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28
Post-graduate student

E-mail: vasichkinaev@yandex.ru

³ Russian State Agrarian University-MAA Timiryazev, Russian Federation
Professor, D. Sc. (Agriculture)

127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49

E-mail: belopuhov@mail.ru

⁴ Samara State University, Russian Federation
Scientific associate

443011, Samara, Ak. Pavlov street, 1

E-mail: kolotvin_alex@rambler.ru

⁵ Volgograd State Technical University, Russian Federation
Professor, D. Sc. (Engineering)

400005, Volgograd, Lenin avenue, 28

E-mail: lysak@vstu.ru

Abstract. Seeds of hard wheat (*Triticum durum*) were treated by pulse pressure (PP), generated by shock wave. Protein content was determined by spectroscopy in the nearest infrared point of the spectrum (NIR). HPLC was used for determining glucose level in samples. Moisture of control seeds was 14.2%. It was not changed in PP 11 MPa samples and was decreased by PP 29 MPa (12.8%); that indicated the damage of seeds. Protein content in control sample was 16.5%. The index was not changed by PP 11 MPa (16.9%), but it increased under PP 29 MPa (17.2%) due to the degradation of starch and relative elevation of protein level. Glucose content in PP 11 MPa samples was less than the control level, probably, due to the acceleration of amino-carbonyl reaction. PP 29 MPa promoted the increase of glucose content due to non-enzymatic starch hydrolysis activation. Thus PP 11 MPa made minor damages without the accumulation of glucose, but PP 29 MPa promoted the ageing due to the accumulation of glucose.

Keywords: pulse pressure; protein content; glucose content; starch hydrolysis.

Введение.

Быстрое ухудшение состояния семян при старении или действии различных факторов связывают с ослаблением стеклообразного состояния биополимеров, гидролизом углеводов и множеством окислительных процессов [1, 6, 8].

При хранении семян протекают термодинамически разрешенные неферментативные процессы, приводящие к старению семян. Таким процессом является неферментативный гидролиз крахмала [2]. По данным Locher и Bucheli [4], в семенах сои при хранении в течение 160 дней при 30°C и 82% относительной влажности воздуха гидролизуется 50 мг·г⁻¹ сырой массы олигосахаридов (вербаскозы, стахиозы, раффинозы) и сахарозы до моносахаров.

При гидролизе полисахаридов происходит внутриклеточное перераспределение воды: некоторая доля связанной воды включается в структуру продуктов (в виде атома Н или группы ОН). При полном гидролизе крахмала в состав сухого вещества может включиться масса воды, составляющая 11,1 % от массы крахмала [2]. Помимо крахмала, гидролизу могут подвергаться другие полимерные вещества [3, 17].

Тем самым, при каждом акте гидролиза в структуру продуктов реакции переходит вода. Исследования [7] показывают, что воздушно-сухие семена содержат много олигосахаридов, в том числе сахарозы, и их содержание снижается при старении.

Старение биополимеров сопровождается их обезвоживанием [16]. Содержание воды в семенах за счет неферментативного гидролиза снижается на 0,5 %. Поскольку в воздушно-сухих семенах нет свободной воды, а вода в воздушно-сухих семенах является, в основном, связанной [8], то для гидролиза расходуется гидратная вода, что приводит к уменьшению влажности семян. В процессе гибели содержание воды уменьшается на 1,5–2 %, т.е. теряется пятая часть связанной воды, что отражает необратимые перестройки макромолекул, сопровождающиеся уменьшением их водоудерживающей способности. Всхожесть семян зависит от их влажности [8].

Возникшие в семенах при неферментативном гидролизе восстанавливающие сахара вступают в реакции с белками и аминокислотами – амино-карбонильную реакцию или реакцию гликозилирования. Роль амино-карбонильной реакции (Амадори-Майяра) в старении семян доказана рядом исследований [5, 6]. Отмечено, что малое содержание восстанавливающих сахаров в сухих семенах является защитой от неферментативной амино-карбонильной реакции.

Известно, что при хранении зерна пшеницы фракционный состав белков не менялся в течение 3-4 лет, а затем происходило снижение гидрофильных свойств и агрегации белковых молекул. Растворимость белков пшеницы понизилась с одновременным повышением содержания аминного азота и уменьшением содержания азота «истинного» белка [3]. Снижение растворимости белков связано также со снижением их водоудерживающих свойств.

Процессы старения в области влажностей семян от 6 до 15 % определяются протеканием неферментативной амино-карбонильной реакции. Конечные продукты реакции труднорастворимы, устойчивы к протеолитическому расщеплению, химически активны и способны образовывать внутримолекулярные сшивки, ковалентно связывать белки, а также некоторые другие вещества, имеющие свободные аминогруппы (ДНК, некоторые липиды), химически инактивировать окись азота (NO) [9, 12].

Таким образом, старение семян сопровождается снижением содержания углеводов и белка, и скорость убыли этих веществ может служить параметром измерения скорости старения семян. Целью исследования было выявление названных признаков старения семян после действия импульсного давления.

Материалы и методы.

Семена пшеницы твердой (*Triticum durum*) обрабатывали импульсным давлением (ИД) 11 и 29 МПа, создаваемым ударной волной; ИД способствует изменению процессов прорастания семян и увеличению продуктивности растений [11, 19, 20].

Партии семян взвешивали, после чего высушивали при температуре 130°C до постоянного веса, вновь взвешивали и по изменению массы рассчитывали содержание воды (влажность), которое выражали в процентах.

Измерение содержания протеина проводили через 1 месяц после обработки импульсным давлением. Определение осуществляли методом ближней ИК-спектроскопии. Метод основан на поглощении энергии специфических длин волн пептидными связями между аминокислотами в молекулах белка, группами ОН молекул крахмала и связями О-Н молекул воды [13]. Метод ближней инфракрасной спектроскопии обладает экспрессностью, высокой точностью и воспроизводимостью. Отклонение данного метода от стандартного метода Кьельдаля (ГОСТ 10846-74) составляет не более 0,5 % [15].

Содержание растворимых сахаров определяли методом ВЭЖХ. Для выделения сахаров навеску семян пшеницы массой 1 г растирали, сахара экстрагировали 70%-ным водным этанолом в течение 20 минут при кипячении. Охлажденную смесь центрифугировали, из супернатанта выпаривали этиловый спирт, полученный раствор отфильтровали. Перед вводом в колонку образец растворили в смеси растворителей ацетонитрил/вода (50/50) и профильтровали через PTFE мембранный фильтр 0,45 мкм.

Анализ проводили на приборе ВЭЖХ Agilent 1260, оборудованном 4-х градиентным насосом, автосамплером, вакуумным дегазатором, рефрактометрическим детектором. Условия хроматографирования: колонка Zorbax NH₂, 250 мм x 4,6 мм, 5 мкм, предколонка Zorbax NH₂, 5 мкм, подвижная фаза ацетонитрил/вода (72/28, v/v), температура колонки 35°C, скорость потока подвижной фазы 1,4 мл·мин⁻¹ (обратное давление 84 бар), объем образца 50 мкл.

Обсуждение результатов

После обработки ИД семена теряли часть связанной воды или быстро включали ее в состав сухого вещества в процессе гидролиза. Из рис. 1а видно, что влажность воздушно-сухих семян в контроле составляла 14,2 %, практически не изменилась при ИД 11 МПа и снизилась при ИД 29 МПа (12,8 %) по сравнению с контролем. Полученные результаты указывают на повреждение семян [8].

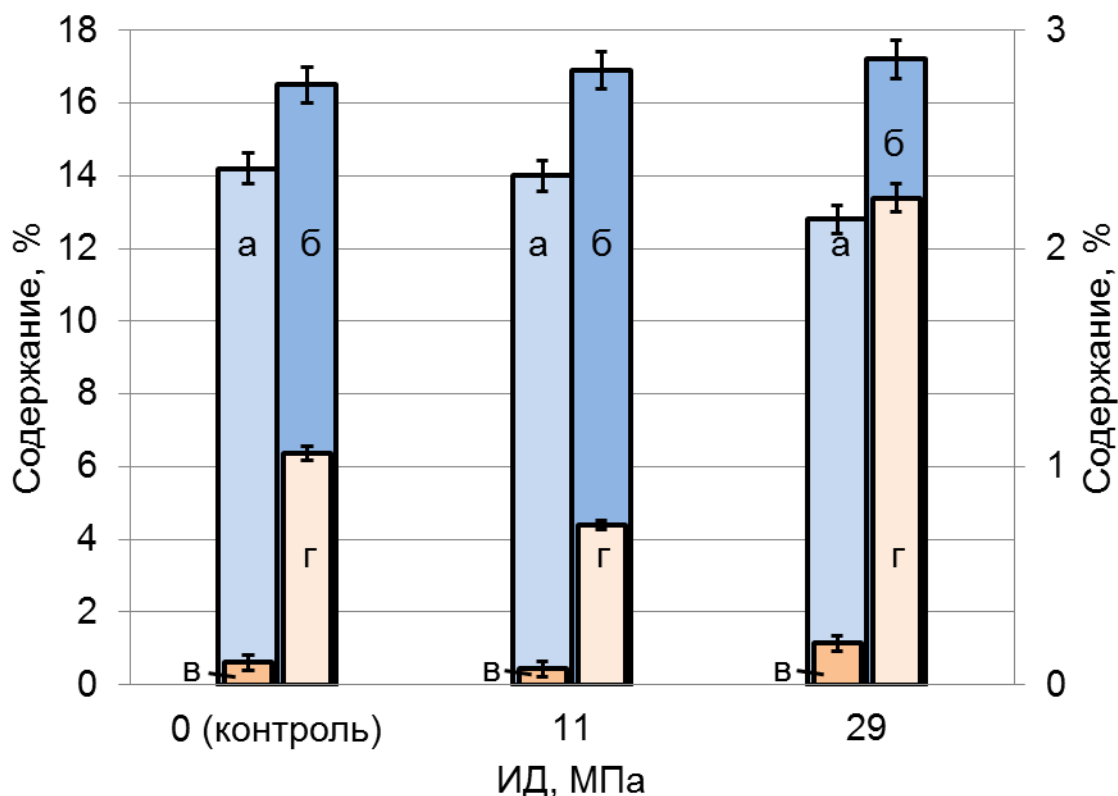


Рис. 1. Влияние ИД на содержание веществ в семени пшеницы
По левой оси: а – вода (влажность), б – протеин через 1 месяц после обработки;
По правой оси: в – глюкоза, г – сахароза.

Начальное содержание протеина в пшенице контрольного образца составляло 16,5 % (рис. 1б). Через месяц после обработки ИД 11 МПа содержание протеина осталось практически неизменным (16,9 %), а после обработки ИД 29 МПа возросло (17,2 %). Это явление можно объяснить ускорением гидролиза крахмала до глюкозы и, как следствие, снижением сухой массы семян с относительным повышением содержания протеина. Видимо, молекулы белка оказались более устойчивыми к неферментативному гидролизу, чем молекулы крахмала.

Из рис. 1в видно, что содержание глюкозы в образцах, полученных при обработке ИД величиной 11 МПа, ниже контрольного. Это может быть связано как со снижением скорости реакции гидролиза крахмала, так и с ускорением протекания неферментативной аминокарбонильной реакции. Последнее явление представляется более вероятным. Из рис. 1г видно, что содержание сахарозы при ИД 11 МПа также снижается. Сахароза не является восстанавливающим сахаром, не вступает в аминокарбонильную реакцию, но может гидролизироваться без участия ферментов до глюкозы и сахарозы, причем глюкоза будет вступать в аминокарбонильную реакцию. Снижение содержания глюкозы и сахарозы в данном случае указывает на повреждение семян. Поскольку содержание протеина и воды изменяется незначительно, уровень повреждений невысок, такие незначительные повреждения при выходе семян из состояния покоя могут вызвать реакцию гиперстимуляции.

Обработка семян ИД 29 МПа приводит к повышению содержания глюкозы и сахарозы в семенах пшеницы (рис. 1в, г). Это связано с появлением микротрещин в молекулах крахмала и ускорением неферментативного гидролиза крахмала до глюкозы. В сухих семенах глюкоза присутствует в следовых количествах в циклической форме, т.е. химически мало активна. При неферментативном гидролизе углеводов в качестве промежуточной формы образуются моносахара в линейной форме, обладающие редуцирующими свойствами. Содержание протеина не изменяется, следовательно, гликозилирование вначале не сопровождается деполимеризацией полипептидной цепи. Однако, снижение гидрофобности биополимеров и снижение влажности семян на 1,4 % по сравнению с контролем указывает на существенные повреждения.

Заключение.

Таким образом, в семенах при старении параллельно протекают 2 процесса: снижение содержания крахмала (путем неферментативного гидролиза до глюкозы) и снижение содержания протеина. Обработка семян ИД влияет на процессы старения. В зависимости от величины ИД влияние может быть различным. ИД 11 МПа оставляет слабые повреждения без накопления глюкозы как промежуточного продукта, ИД 29 МПа способствует ускорению процессов старения за счет разрушения молекул крахмала и накопления глюкозы.

Примечания:

1. Bernal-Lugo, I. Changes in soluble carbohydrates during seed storage/ I. Bernal-Lugo, A.C. Leopold // *Plant Physiol.* 1992. V. 98. P. 1207-1210.
2. Influence of Pulse Pressure on the State of Biopolymers and the Probability of Hydrolysis of Starch in Seeds [Electronic resource] / Pavlova V.A., Vasichkina E.V., Nefed'eva E.E., Lysak V.I. // *European Journal of Molecular Biotechnology.* 2013. Vol. 1, № 1. С. 38-44. - URL : http://ejournal8.com/journals_n/1386101296.pdf.
3. Jones, D.B. Gersdorff C.E.F. The effect of storage on the proteins of wheat, white flour and whole-wheat flour// *Cereal Chem.* 1941. № 18. P. 417.
4. Locher R., Bucheli P. Comparison of Soluble Sugar Degradation in Soybean Seed under Simulated Tropical Storage Conditions // *Crop Sci.* 1998. V. 38. P. 1229-1235.
5. Murthy U.M.N., Sun W.Q. Protein Modification by Amadori and Maillard Reaction during Seed Storage: Roles of Sugar Hydrolysis and Lipid Peroxidation // *J. Exp. Bot.* 2000. V. 51. P. 1221-1228.
6. Sun W.Q., Leopold A.C. The Maillard Reaction and Oxidative Stress during Aging of Soybean Seeds // *Physiol. Plant.* 1995. V. 94. P. 94-104.
7. Veselova, T.V. Possible Involvement of Aquaporins in Water Uptake by Pea Seeds Differing in Quality / T.V. Veselova, V.A. Veselovsky // *Russian Plant Physiology.* 2006. Vol. 53, №1. P. 96-101.

8. Veselovsky, V.A. Lipid Peroxidation, Carbohydrate Hydrolysis, and Amadori-Maillard Reaction at Early Stages of Dry Seed Aging / V.A. Veselovsky, T.V. Veselova // Russian Plant Physiology. 2012. Vol. 59. № 6. p. 811-817.
9. Anisimov V.N. Molekulyarnye i fiziologicheskie mekhanizmy stareniya/ V.N. Anisimov. SPb: «Nauka», 2003. 468 s.
10. Bartenev, G.M. Fizika polimerov / G.M. Bartenev, S.Ya. Frenkel' / Pod red. d-ra fiz.-mat. nauk A.M. El'yashevicha. L.: Khimiya, 1990. 432 s.
11. Konstruktsii ustroystv dlya predpovevnoi obrabotki semyan davleniem / Fomichenko V.V., Golovanchikov A.B., Belopukhov S.L., Nefed'eva E.E. // Izv. vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya. 2012. № 2. C. 128-131.
12. Kudinov Yu.G. Patologicheskie posledstviya nakopleniya konechnykh produktov nefermentativnogo glikozilirovaniya pri starenii // Probl. stareniya i dolgoletiya. 1994. T. 4. S. 434-451.
13. Metodika analiza zerna i zernoproduktov metodom spektroskopii otrazheniya v blizhnei infrakrasnoi oblasti (NIR). Rekomendatsiya ICC № 202 (International Association for Cereal Science and Technology - Mezhdunarodnoe obshchestvo po khimii zerna).
14. Nefed'eva E.E. Influence of Pulse Pressure on Seed Quality and Yield of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) [Electronic resource] / E.E. Nefed'eva, T.V. Veselova, V.A. Veselovskii, V.I. Lysak // European Journal of Molecular Biotechnology. 2013. Vol. 1, № 1. C. 12-27. - URL : http://ejournal8.com/journals_n/1386100830.pdf.
15. Pankov, S.A., Borzenko, A.G. Ispol'zovanie blizhnei infrakrasnoi spektroskopii dlya analiza zerna pshenitsy // Vestn. Mosk. un-ta. Seriya 2: Khimiya. –T. 47. - № 3.- S. 174-176.
16. Serami E., Vlassara Kh., Braunli M. Glyukoza i starenie // V mire nauki. 1987. № 7. S. 42-49.
17. Soderzhanie prolina v prorastayushchikh semenakh grechikhi i ikh kachestvo pri deistvii impul'snogo davleniya i ponizhennykh temperatur / Shilenkov A.V., Mazei N.G., Nefed'eva E.E., Khryanin V.N. // Sel'skokhozyaistvennaya biologiya. Seriya «Biologiya rastenii». 2008. № 5 (sentyabr'-oktyabr'). C. 70-77.
18. Stepanenko, B.N. Khimiya i biokhimiya uglevodorodov (monosakharidy) / B.N. Stepanenko. M.: Vyssh. shk., 1977. C. 61-72.
19. Tekhnologicheskii priem obrabotki semyan kul'turnykh rastenii udarnym davleniem / Fomichenko V.V., Golovanchikov A.B., Lysak V.I., Nefed'eva E.E., Shaikhiev I.G. // Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta. 2013. № 18. C. 188-190.
20. Khryanin V.N. Deistvie impul'snogo davleniya na sodержanie fitogormonov, protsessy rosta i razvitiya grechikhi / V.N. Khryanin, E.E. Nefed'eva, N.G. Mazei // Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo. Seriya: Biologiya. - 2001. S. 102-106.

УДК 581.1:631.531.027.3:631.559:581.143

Влияние обработки ИД на содержание протеина и некоторых сахаров в семенах пшеницы

¹ В.А. Павлова

² Е.В. Васичкина

³ С.Л. Белопухов

⁴ А.А. Колотвин

⁵ В.И. Лысак

¹ Волгоградский государственный технический университет, Россия

Аспирант

400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

E-mail: Violetta_Mir@mail.ru

² Волгоградский государственный технический университет, Россия

Аспирант

400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

E-mail: vasichkinaev@yandex.ru

³ Российский государственный аграрный университет - Московская Сельскохозяйственная Академия им. К.А. Тимирязева, Россия

Профессор, д.с.-х.н.

127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49

E-mail: beloruhov@mail.ru.

⁴ Самарский государственный университет, Россия

Научный сотрудник

443011, г. Самара, ул. Ак. Павлова, 1

E-mail: kolotvin_alex@rambler.ru

⁵ Волгоградский государственный технический университет, Россия

Член-корреспондент РАН, профессор, доктор технических наук

400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

E-mail: lysak@vstu.ru

Аннотация. Семена пшеницы твердой (*Triticum durum*) обрабатывали импульсным давлением (ИД), создаваемым ударной волной. Содержание протеина определяли методом БИК-спектроскопии. Содержание глюкозы определяли методом ВЭЖХ. Влажность семян в контроле составляла 14,2%, не изменилась при ИД 11 МПа и снизилась при ИД 29 МПа (12,8%), что указывало на повреждение семян. Содержание протеина в контрольном образце составляло 16,5%. При ИД 11 МПа содержание протеина осталось неизменным (16,9%), а при ИД 29 МПа возросло (17,2%) в связи с ускорением распада крахмала и относительным повышением содержания протеина. Содержание глюкозы в семенах при ИД 11 МПа было ниже контрольного, что могло быть связано с ускорением амино-карбонильной реакции. ИД 29 МПа привело к повышению содержания глюкозы, вероятно, из-за активизации неферментативного гидролиза крахмала. Таким образом, ИД 11 МПа оставило слабые повреждения без накопления глюкозы, ИД 29 МПа способствовало ускорению старения за счет накопления глюкозы.

Ключевые слова: импульсное давление; содержание белка; содержание глюкозы; гидролиз крахмала.