

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

Influence of Pulse Pressure on the State of Biopolymers and the Probability of Hydrolysis of Starch in Seeds

¹ Violetta Pavlova

² Ekaterina Vasichkina

³ Elena Nefed'eva

⁴ Vladimir 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 Volgograd State Technical University, Russian Federation
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28

Professor, D. Sc. (Biology)

E-mail: nefedieva@rambler.ru

⁴ Volgograd State Technical University, Russian Federation
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28

Professor, D. Sc. (Engineering)

E-mail: lysak@vstu.ru

Abstract. Damage of seeds which leads to destruction of the crystal lattice and the phase transition of polymers is formed under the pulse pressure (PP) treatment. Biopolymers such as starch compressed under specific conditions can be changed from crystalline to a glassy state; this transition is known to extend the life of seeds. The aging of seeds is involved in the enzymatic glycosylation of proteins and nucleic acids. Reducing sugars which have been produced in seeds by non-enzymatic hydrolysis enter into reaction of glycosylation with proteins and amino acids actively.

The authors studied the water absorption by seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench., cultivar Saulyk) treated by PP. The values of PP which were used to treat had an influence on water absorption during the first hours of imbibition. When water content was 60%, hydrolysis of reserve substances could begin, so water potential was created by osmotically active molecules. Gibbs energy calculation by method of groups' contribution indicated the reduction in probability of starch hydrolysis in plant seeds during transition from the crystalline to the glassy state.

Keywords: pulse pressure; biopolymer; destruction; starch; buckwheat; hydrolysis.

Введение. В качестве фактора, действующего на растения, было выбрано импульсное давление (ИД), создаваемое прохождением ударной волны. ИД в интервале 3–35 МПа способствует стимулированию физиологических процессов в семенах и растениях, ведущих к

увеличению урожая, и отбору устойчивых к данному воздействию форм (в дозах, снижающих всхожесть) [1].

У организмов в состоянии покоя (воздушно-сухие семена, пыльца, споры) физические воздействия оставляют скрытые (потенциальные) повреждения, которые реализуются во время перехода клеток в жизнедеятельное состояние [2]. Аналогично в семени при обработке ИД образуются повреждения, которые развиваются в дальнейшем при хранении. Эти эффекты могут быть связаны с дроблением, появлением трещин, которые будут продолжать расти в процессе хранения, разрушением кристаллической решетки или фазовыми переходами полимеров.

Полимеры (и, в частности, биополимеры в семенах) могут находиться в различных фазово-агрегатных состояниях. Для полимеров характерны кристаллическое, и аморфное состояния, причем к последнему относятся стеклообразное, высокоэластическое, вязкотекучее состояния. Переходы между тремя последними состояниями называют релаксационными. Их температуры существенно зависят от скорости деформации полимера и могут смещаться на десятки градусов [3]. Переходы из одного состояния в другое зависят от температуры и давления. При всестороннем сжатии полимера при некотором давлении $P_{ст}$ (давлении стеклования) полимер переходит в стеклообразное состояние. Известно, что переход биополимеров в стеклообразное состояние продляет жизнь семян [4].

Крахмал в семенах может находиться в кристаллическом или аморфном (стеклообразном) состоянии. Быстрое ухудшение состояния семян связывают с ослаблением стеклообразного состояния, быстрым гидролизом углеводов и множеством окислительных процессов [4, 5].

Старение семян [6], как и животных и человека [7], сопряжено с процессом неферментативного гликозилирования белков и нуклеиновых кислот (реакция Амадори-Мейяра).

Нуклеиновые кислоты и белки могут быть модифицированы с помощью присоединения сахаров к их свободным аминогруппам, что ведет к структурной и функциональной перестройке молекул. Глюкоза как альдогексоза способна без участия ферментов модифицировать белки в условиях *in vivo* [8].

Процесс неферментативного гликозилирования включает два этапа. Вначале происходит обратимое образование начальных продуктов за счет связывания глюкозы со свободными аминогруппами с образованием оснований Шиффа и последующим их превращением в более стабильные продукты Амадори. Затем происходит необратимое образование промежуточных карбонильных соединений и конечных продуктов глубокого гликозилирования (AGE – advanced glycosylation endproducts). Конечные продукты реакции Мейяра труднорастворимы, устойчивы к протеолитическому расщеплению, весьма активны химически и способны образовывать внутримолекулярные сшивки, ковалентно связывать белки, а также некоторые другие вещества, имеющие свободные аминогруппы (ДНК, некоторые липиды), химически инактивировать окись азота (NO) [7, 8].

Старение семян сопряжено со снижением содержания в них воды [6]. Можно предположить, что снижение содержания воды в семенах происходит во время гидролиза олигосахаридов при хранении [4]. При гидролизе полисахаридов происходит перераспределение воды: часть связанной воды включается в структуру продуктов. В частности, при полном гидролизе крахмала (процесс термодинамически возможен при н.у., следовательно, может протекать неферментативно) по уравнению (1) в состав сухого вещества может включиться масса воды, составляющая 11,1 % от массы крахмала:



Помимо крахмала, гидролизу могут подвергаться другие полимерные вещества, возможно образование кристаллогидратов, не разрушающихся при температуре высушивания семян.

Расчеты [6] показали, что при гидролизе 50,07 мг/г олигосахаридов (вербаскозы, стахиозы, раффинозы и сахарозы) влажность семян должна снизиться на 0,4–0,5 %. Эта величина такого же порядка, что и снижение влажности при переходе из фракции нормальных семян I во фракцию семян II, из которых вырастают проростки с морфологическими дефектами. Поэтому можно предположить, что начало старения и уменьшение влажности семян вызваны гидролизом олигосахаридов, при котором

возрастает количество глюкозы. Измерение содержания глюкозы в порошке сухих семян термохемилюминесцентным методом и глюкометром в супернатанте гомогената порошка в дистиллированной воде показали, что семена фракции II содержат в 2–3 раза больше глюкозы, чем семена фракции I [6].

Возникшие в семенах при неферментативном гидролизе редуцирующие сахара активно вступают в реакции гликозилирования с белками и аминокислотами. Малое содержание восстанавливающих сахаров в сухих семенах является защитой от неферментативной amino-карбонильной реакции, которая активно протекает в области влажностей от 6 до 15 % [6].

Оценить возможность самопроизвольного протекания процесса гидролиза крахмала в семенах возможно с помощью изобарно-изотермического потенциала (энергия Гиббса).

Материалы и методы. В экспериментах использовали растения гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench.) сорта Саулык. Обработку семян с ИД проводили в соответствии со схемой (рис.1) [9]. На дно контейнера из нержавеющей стали (1) укладывали порошковые кассета (2) с семенами (3), закрытыми сетчатым материалом. Контейнер заполняли водой (4), закрепляли водостойкое взрывчатое вещество (5) с массой Q на расстоянии R от поверхности семян при помощи пластины (6). Производили детонацию с использованием электродетонатора (7).

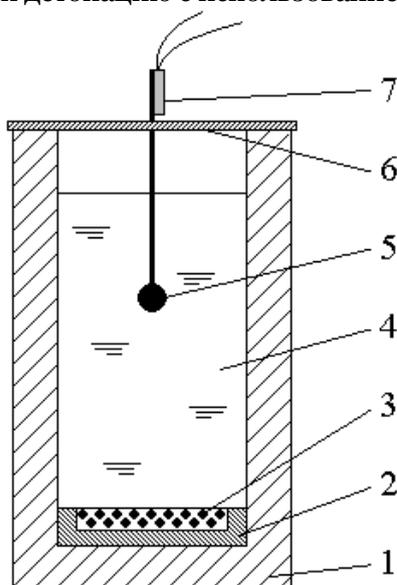


Рис. 1. Схема устройства для обработки семян ИД:

1 - контейнер; 2 - кассета с семенами (3); 4 - вода; 5 - взрывчатое вещество; 6 - пластина;
7 - электродетонатор

Контрольные семена известной массы помещали в воду на 2 часа, а опытные, также предварительно взвешенные, подвергали ударно-волновой обработке, после чего продолжали выдерживать в воде. Через 1 час и 2 часа все партии семян взвешивали и определяли содержание воды.

Расчет изобарно-изотермического потенциала производился по методу Ван Кревелена и Чермена [10]. Данный метод позволяет учитывать особенности фазового состояния полимера, подвергающегося гидролизу. При расчете было принято, что крахмал состоит на 100% из амилозы, а также то, что глюкоза, образующаяся в результате процесса гидролиза амилозы, находится в ациклическом состоянии.

Обсуждение результатов. В первые часы набухания вода поглощается в основном за счет матричного потенциала биополимеров, а также путем адсорбции на поверхности частиц. Только при достижении 60 %-ной оводненности начинается гидролиз запасных веществ, появляются осмотически активные молекулы, создающие водный потенциал [11]. Следовательно, поглощение воды в первые часы связано с состоянием биополимеров.

Предположим, что под действием ИД происходили следующие изменения состояния биополимеров: 1) разрыхление структуры и увеличение пространства между частицами; 2) рост имевшихся до воздействия микротрещин и разламывание частиц; 3) дополнительное увеличение адсорбирующей поверхности за счет разломов и микротрещин.

Через 1 час после действия ИД поглощение воды нарастало линейно (рис. 2), поскольку вода, видимо, поступала в промежутки между макрочастицами.

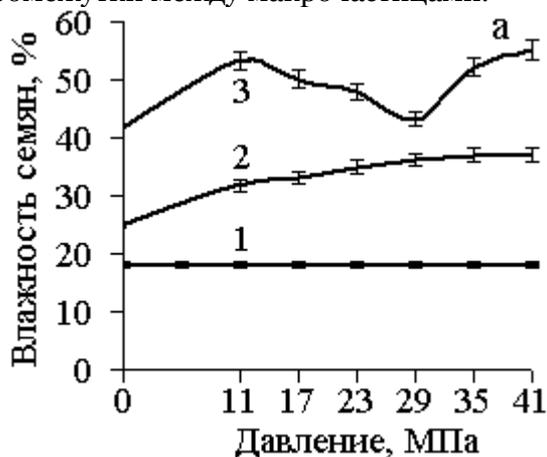


Рис. 2. Поглощение воды семенами гречихи в зависимости от ИД: а – сразу после обработки: 1 – сухие семена, 2 – 1 час, 3 – 24 час

Через 2 час обнаружены три экстремума на кривой зависимости поглощения воды от величины воздействующего ИД. Следовательно, на поглощение воды действовали, по крайней мере, три процесса, которые изменялись по-разному в зависимости от величины ИД. Отметим, что в это время поглощение и удержание воды связано с процессами адсорбции и взаимодействия гидрофильных группировок. Усиление поглощения воды при низких ИД (11–20 МПа) было связано с расширением промежутков между частицами и увеличением доступности гидрофильных групп для воды. Торможение поглощения воды при ИД 23–29 МПа могло быть вызвано смещением или разломом гидрофильных частиц. Эффект проявлялся не сразу, а в процессе набухания, когда биополимеры переходили в коллоидное состояние, формировали третичную и четвертичную структуру, активно включая гидрофильно-гидрофобные взаимодействия. ИД 35–41 МПа вызывали сильные изменения структуры, при которых большинство семян утрачивали способность к прорастанию, однако способствовали росту адсорбирующей поверхности и усилению поглощения воды через 1–2 час набухания. В дальнейшем, когда в процесс поглощения воды вовлекались осмотически активные продукты гидролиза, он останавливался.

В целях сравнения устойчивости к гидролизу амилозы, находящейся в аморфном (стеклообразном) и кристаллическом состоянии были проведены расчеты термодинамических функций для двух граничных состояний (амилоза полностью аморфная, амилоза полностью кристаллическая).

Для процесса гидролиза, при котором исходная амилоза находится в аморфном (стеклообразном) состоянии, получены следующие зависимости:

$$\Delta G_p^0 = \Delta H_p^0 - \Delta S_p^0 \cdot T \quad (2)$$

$$\Delta G_{p,ак}^0 = -76857 + 177,78 \cdot T \text{ Дж/моль} \quad (3)$$

$$\Delta H_p^0 = -76857 \text{ Дж/моль} \quad (4)$$

$$\Delta S_p^0 = -177,78 \text{ Дж/моль} \quad (5)$$

Для процесса гидролиза, при котором исходная амилоза находится в кристаллическом состоянии, получены следующие зависимости:

$$\Delta G_{p,кк}^0 = -68477 + 125,4 \cdot T \text{ Дж/моль} \quad (6)$$

$$\Delta H_p^0 = -68477 \text{ Дж/моль} \quad (7)$$

$$\Delta S_p^0 = -125,4 \text{ Дж/моль} \quad (8)$$

Так как при изменении температуры ΔH_p^0 и ΔS_p^0 меняются мало, то в первом приближении можно считать ΔG_p^0 линейной функцией от температуры. Для большинства полимеров экспериментальные величины изменения ΔG_p^0 от T в интервале 400–600 К практически всегда являются линейной функцией [12].

При $T_{\text{пред}}$ система находится в равновесии, в ней не протекают процессы гидролиза и поликонденсации [12]. Определим температуру, при которой система будет находиться в равновесии $\Delta G_p^0 = 0$:

$$T_{\text{аморф,пред}} = \frac{\Delta H_p^0}{\Delta S_p^0} = \frac{-76857}{-177,78} = 432(K) = 159(^{\circ}C) \quad (9)$$

$$T_{\text{крист,пред}} = \frac{\Delta H_p^0}{\Delta S_p^0} = \frac{-68477}{-125,4} = 546(K) = 273(^{\circ}C) \quad (10)$$

Таким образом, крахмал, находящийся в кристаллическом состоянии реакционно способен на большем интервале температур и менее устойчив к гидролизу.

Рассчитаем ΔG_p^0 при температуре опыта $T = 20^{\circ}C$:

$$\Delta G_{\text{крист,р,293}}^0 = -68477 + 125,4 \cdot 293 = -31734,8 \text{ Дж/моль} \quad (11)$$

$$\Delta G_{\text{аморф,р,293}}^0 = -76857 + 177,78 \cdot 293 = -24767,46 \text{ Дж/моль} \quad (12)$$

Так как $\Delta G_{\text{р,293}}^0 < 0$, то в обеих системах возможно самопроизвольное протекание процесса гидролиза. Однако в системе, в которой амилоза находится в кристаллическом состоянии, химическое сродство выше, т.е. сильнее стремление системы к протеканию данного процесса и тем дальше система находится от состояния равновесия.

Заключение. Как видно из вышеизложенного, изменение состояния полимеров чрезвычайно сложно, однако оно зависит от параметров на фронте ударной волны – давления, температуры и скорости их изменения. Следовательно, оказывая влияние на параметры стеклообразного состояния биополимеров семян путем обработки ИД, мы способствуем изменениям биополимеров и параметров выхода из состояния покоя, вероятности протекания процессов их гидролиза. В результате развивается последствие ИД у проростков и взрослых растений.

Примечания:

1. Nefed'eva E.E. The Influence of Impulse Pressure on the Phytohormone Content, Growth and Crop Productivity of Buckwheat Plants (*Fagopyrum esculentum* Moench., cv. Aromat) / Nefed'eva E.E. // *Greenwich Journal of Science and Technology*. 2003. №3. P. 123-135.
2. Кузин А.М. Стимулирующее действие ионизирующего излучения на биологические процессы / А.М. Кузин. М.: Атомиздат, 1977. 133 с.
3. Бартенев Г.М. Физика полимеров / Г. М. Бартенев, С. Я. Френкель / Под ред. д-ра физ.-мат. наук А. М. Ельяшевича. Л.: Химия, 1990. 432 с.
4. Bernal-Lugo I. Changes in soluble carbohydrates during seed storage/ I. Bernal-Lugo, A.C. Leopold // *Plant Physiol*. 1992. V. 98. P. 1207-1210.
5. Bernal-Lugo I. Review article. The dynamics of seed mortality / I. Bernal-Lugo, A. Leopold // *Journal of Experimental Botany*. 1998. V. 49. P. 1455-1461.
6. Veselova T.V. Investigation of atypical germination changes during accelerated ageing of pea seeds/ T.V. Veselova, V.A.Veselovsky // *Seed Science and Technology*. 2003. V. 31. P. 517-530.
7. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Санкт-Петербург: Наука, 2003. 468 с.
8. Кудинов Ю. Г. Патологические последствия накопления конечных продуктов неферментативного гликозилирования при старении // *Пробл. старения и долголетия*. 1994.

Т. 4. С. 434-451.

9. Патент РФ № 2083073, 07.10.1997. Атрощенко Э.С., Хрянин В.Н., Атрощенко Е.Э., Теплов А.Д., Розен А.Е., Ионова А.Н. Способ предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур // Патент России № 2083073. 1997. Бюл. № 19.

10. Кревелин Д.В. Ван Свойства и химическое строение полимеров/ Д.В. Ван Кревелен. М.: Химия, 1976. 114 с.

11. Obroucheva, N.V. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination/ N.V. Obroucheva, S.V. Lityagina, G.V. Novikova, I.A. Sin'kevich //AoB Plants. Pls 008. P. 1-14.

12. Духанин Г.П. Термодинамические расчеты химических реакций/Г.П. Духанин, В.А. Козловцев. Волгоград: ВолгГТУ, 2010. 96 с.

References:

1. Nefed'eva E.E. The Influence of Impulse Pressure on the Phytohormone Content, Growth and Crop Productivity of Buckwheat Plants (*Fagopyrum esculentum* Moench., cv. Aromat) / Nefed'eva E.E. // Greenwich Journal of Science and Technology. 2003. №3. P. 123-135.

2. Kuzin A.M. Stimuliruyushchee deistvie ioniziruyushchego izlucheniya na biologicheskie protsessy/ A.M. Kuzin. M.: Atomizdat, 1977. 133 s.

3. 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.

4. Bernal-Lugo I. Changes in soluble carbohydrates during seed storage/ I. Bernal-Lugo, A.C. Leopold //Plant Physiol. 1992. V. 98. P. 1207-1210.

5. Bernal-Lugo I. Review article. The dynamics of seed mortality / I. Bernal-Lugo, A. Leopold // Journal of Experimental Botany. 1998. V. 49. P.1455-1461.

6. Veselova T.V. Investigation of atypical germination changes during accelerated ageing of pea seeds/ T.V. Veselova, V.A.Veselovsky // Seed Science and Technology. 2003. V. 31. P. 517-530.

7. Anisimov V.N. Molekulyarnye i fiziologicheskie mekhanizmy stareniya. Sankt-Peterburg: Nauka. 2003 g. 468 s.

8. Kudinov Yu.G. Patologicheskie posledstviya nakopleniya konechnykh produktov nefermentativnogo glikozilirovaniya pri starenii // Probl. stareniya i dolgoletiya. 1994. T. 4. S. 434-451.

9. Patent RF № 2083073, 07.10.1997. Atroshchenko E.S., Khryanin V.N., Atroshchenko E.E., Teplov A.D., Rozen A.E., Ionova A.N. Sposob predposevnoi obrabotki semyan sel'skokhozyaistvennykh kul'tur// Patent Rossii № 2083073. 1997. Byul. № 19.

10. Krevelin D.V. Van Svoistva i khimicheskoe stroenie polimerov/ D.V. Van Krevelen. M.: Khimiya, 1976. 114 s.

11. Obroucheva N.V. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination / N.V.Obroucheva, S.V. Lityagina, G.V. Novikova, I.A. Sin'kevich //AoB Plants. Pls 008. P. 1-14.

12. Dukhanin G.P. Termodinamicheskie raschety khimicheskikh reaktсии /G.P. Dukhanin, V.A. Kozlovcev. Volgograd: VolgGTU, 2010. 96 s.

УДК 581.1:631.531.027.3:631.559:581.143

Влияние импульсного давления на состояние биополимеров и вероятность протекания процесса гидролиза крахмала в семенах

¹ Виолетта Александровна Павлова

² Екатерина Владимировна Васичкина

³ Елена Эдуардовна Нефедьева

⁴ Владимир Ильич Лысак

¹ Волгоградский государственный технический университет, Россия
400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28
Аспирант

E-mail: Violetta_Mir@mail.ru

² Волгоградский государственный технический университет, Россия
400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

Аспирант

E-mail: vasichkinaev@yandex.ru

³ Волгоградский государственный технический университет, Россия
Доктор биологических наук, доцент
400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

E-mail: nefedieva@rambler.ru

⁴ Волгоградский государственный технический университет, Россия
Член-корреспондент РАН, профессор, доктор технических наук
400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

E-mail: lysak@vstu.ru

Аннотация. При обработке импульсным давлением в семенах образуются повреждения, которые приводят к разрушению кристаллической решетки и фазовым переходам полимеров. При сжатии в определенных условиях биополимеры (крахмал) могут переходить из кристаллического в стеклообразное состояние, что продляет жизнь семян. Старение семян сопряжено с процессом неферментативного гликозилирования белков и нуклеиновых кислот. Возникшие в семенах при неферментативном гидролизе редуцирующие сахара активно вступают в реакции гликозилирования с белками и аминокислотами.

Авторами изучено поглощение воды семенами гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench.) сорта Саулык, обработанными ИД. Величина ИД, использованного при обработке, влияла на поглощение воды в первые часы. При достижении 60%-ной оводненности начинался гидролиз запасных веществ, появлялись осмотически активные молекулы, создающие водный потенциал. Расчет энергии Гиббса методом групповых вкладов указывал на понижение вероятности протекания процесса гидролиза крахмала в семенах растений при переходе из кристаллического в стеклообразное состояние.

Ключевые слова: импульсное давление; биополимер; разрушение; крахмал; гречиха; гидролиз.