

Образец исследованного шубата Ш1 между фракциями стеролов и фосфолипидов присутствует не идентифицированная фракция. Данная фракция расположена значительно ближе к фосфолипидам и имеет значение $R_f = 0,10$. Аналогичная фракция обнаружена в образцах шубата Ш2, Ш4 и Ш5. Кроме того, в образцах шубата Ш2, Ш3, Ш4 и Ш5 замечена не идентифицированная фракция, расположенная над фракцией стеролов, которая имеет величину $R_f = 0,23$.

Образец шубата Ш2 отличается от других проб отсутствием не идентифицированной фракции ($R_f = 0,40$), которая мигрирует между стеролами и свободными жирными кислотами. Отметим, что эта фракция присутствует в образцах других шубатов. Значение R_f не идентифицированной фракции №5 для образцов Ш1, Ш4 равно 0,40; Ш3 – 0,39; Ш5 – 0,38.

Известно [7,8], что наличие свободных жирных кислот в шубате обуславливает его лечебный эффект, обусловленный легкой доступностью жирных кислот и других промежуточных продуктов гидролиза глицеролов и стеролов. Жирные кислоты связывают свободные радикалы в тканях, тем самым предотвращая опасное окисление мембранных липидов.

Триацилглицеролы молочного жира коровьего молока в основном состоят из смеси глицеролов. Они составляют 98-99% липидов молока, диацилглицеролы содержатся около 1%, моноацилглицеролы – 0,02% [9].

В результате тонкослойной хроматографии на силикагеле показано, что составы липидов свежего и замороженного молока сходны в содержании общих компонентов, таких как фосфолипиды, стеролы и триацилглицеролы; в то же время в образцах замороженного верблюжьего молока выявлено присутствие свободных жирных кислот. Анализируя не идентифицированные фракции, можно предположить, что фракция №2 соответствует моноацилглицеролам ($R_f = 0,10$), фракция №3 – 1,2- или 1,3-диацилглицеролам ($R_f = 0,19-0,25$), №5 – производным стеролам ($R_f = 0,38-0,40$). Однако такие предположения требуют дополнительных исследований и подтверждения другими методами исследования.

По данным таблицы 1 следует, что первая фракция во всех образцах верблюжьего молока и шубата по эталону соответствует фосфолипидам, находится на стартовой позиции хроматограммы, значения R_f соответствует 0,04 и 0,05.

В свежем молоке присутствуют липолитические ферменты, которые обладают определенной активностью в молоке. Липолитические ферменты гидролизуют липиды на промежуточные компоненты, которые играют важную биологическую и физиологическую роль в живом организме. Содержание и активность этих ферментов в сыром молоке в основном зависят от зоотехнических факторов, условий получения и транспортировки молока. Отметим, что природа этих ферментов как нативная, так и микробная.

При замораживании молока многие из этих липолитических ферментов дезактивируются. Однако, несмотря на замораживание, в образцах молока наблюдается частичный гидролиз липидов. Известно [8,9], что при этом создаются благоприятные условия для развития флуоресцирующих бактерий, которые продолжают гидролиз липидов молока.

Качественный состав липидов верблюжьего молока и шубата проводили методом тонкослойной хроматографии. Во многих литературных источниках имеется информация о коровьем, овечьем и козьем молоке [10,11,12,13].

Сравнительный анализ влияния температуры на состав липидов молока показал наличие не идентифицированных фракций, которые являются продуктами частичного гидролиза липидов. Таким образом, в образцах свежего молока выявлены подфракции гидролиза липидов молока, свидетельствующие об активности липолитических ферментов. В образцах замороженного молока отмечаются дополнительные продукты распада липидов, что обусловлено активностью бактерий при низкой температуре.

В результате проведения тонкослойной хроматографии на силикагеле определено, что в состав липидов молока *C. bactrianus*, *C. dromedarius* и их гибридов входят фосфолипиды, стеролы, свободные жирные кислоты и триацилглицеролы. В процессе брожения верблюжьего молока и его превращения в шубат появляются дополнительные фракции, находящиеся около стеролов и фосфолипидов.

Литература

1. Конуспаева Г.С., Нармуратова М.Х., Серикбаева А.Д., Иващенко А.Т., и др. Сравнительное изучение физико-химических параметров молока *Camelus bactrianus* и *Camelus dromedarius* Алматинской и Атырауской областей // Вестник Павлодарского университета. Биологические науки Казахстана, Научный журнал Павлодарского государственного педагогического института, - 2006. - №1-2, 95-104.
2. Нармуратова М.Х., Конуспаева Г.С., Мелдебекова А.А., Иващенко А.Т. Изучение физико-химического состава верблюжьего молока Южно-Казахстанской области // Вестник КазНУ, сер. биологическая, 2008 г., №1, 176-178.
3. B. Faye, G. Konuspayeva, S. Messad, G. Loiseau. Discriminant milk components of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*), dromedary (*Camelus dromedarius*) and hybrids // Journal of Dairy Science and Technology. 88 (2008), DOI: 10.1051/dst:2008008, 607-617.
4. G. Konuspayeva, B. Faye, G. Loiseau, D. Leveieux. Lactoferrin and Immunoglobulin content in camel milk (*C. bactrianus*, *C. dromedarius* and hybrids) from Kazakhstan // Journal of Dairy Sciences. 2007, 90, 38-46.

5. G. Konuspayeva, E. Lemarie, B. Faye, G. Loiseau, D. Montet. Fatty acid and cholesterol composition of camel's (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius* and hybrids) milk in Kazakhstan // *Journal of Dairy Science and Technology*. 88 (2008) 327-340.
6. Lemarie E.. *Analyse de la variabilite des teneurs en lipids du lait de chamelle au Kazakhstan // UMII. – Montpellier (France), 2006 – P. 58-67.*
7. Шарманов Т.Ш., Жангабылов А.К. *Лечебные свойства кумыса и шубата. – Алма-Ата: Гылым, 1991.- 216 с.*
8. Твердохлеб Г.В., Раманаускас Р.И. *Химия и физика молока и молочных продуктов. – М.: ДеЛи принт, 2006. – С. 115.*
9. Kappaler S., Ackerman M., Z.Farah, Puchan Z. *Sequense of analyses of camel (Camelus dromedarius) lactoferrin // Int. Dairy Journal. – 1999. - #9. – P. 481-486.*
10. Филлипс Д. *Трехмерная структура молекулы фермента. // В сборнике: Молекулы и клетки, пер. с англ. – 1968 Oléagineux, 1973, 28, 87-92. Method CIRAD-AMIS / US49 – ANALYSES.*
11. Astier C., Rock E., Chardigny J.M., Borel P., Coulon J.B. *Effect of geographic origin and heat treatment on the nutritional quality of cow milk // Renc. Rech. Ruminants, 2004, 11., P 75-76.*
12. Besle J.M., Lamaison J.L., Pradel P., Frasse D., Viala D., Martin B. *Flavonoids, from forages to milk // Renc. Rech. Ruminants, 2004, 11., P 67-69.*
13. Dewhurst R., Coulmier D. *Effects of alfalfa-based products on fatty acids in milk from Holstein Friesian cows // Renc. Rech. Ruminants, 2004, 11., P 79*

Тұжырым

Жұмыста Оңтүстік Қазақстан облысының әртүрлі жыл мезгілдерінде алынған *C. bactrianus*, *C. dromedarius* және гибрид түйе сүттері мен шұбаттарына сапалық анализ жасалынды. Силикагелде жұқа қабатты хроматографияны жүргізу барысында түйе сүтінің құрамында фосфолипидтер, стеролдар, бос май қышқылдары және триацилглицеролдар кіретіндігі анықталды. Түйе сүтінің ашу және шұбатқа айналу процесінде стерол және фосфолипидтердің аралығында қосымша фракциялар кездесті.

Summary

By the thin-layer chromatography on silicagel it was identified, that milk of *C. bactrianus*, *C. dromedarius* and hybrids contains phospholipids, sterols, free fatty acids and triacilglicerols. In the process of fermentation and transformation of milk into shubat there are formed the new fractions near sterols and phospholipids.

УДК 576.3

Оразова С.Б., Богуспаев К.К., Иващенко А.Т., Бисенбаев А.К.
ВЛИЯНИЕ ПРАЙМИНГА НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ
(СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА И ПЕРОКСИДАЗА) КУКУРУЗЫ С ПРИЗНАКОМ ЦМС
ПРИ РАЗЛИЧНОМ ЗАСОЛЕНИИ
 (Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Выявлено влияние предпосевной обработки семян биологически активными препаратами из биогумуса на функциональную активность супероксиддисмутазы и пероксидазы в листьях и корнях 10-дневных проростков кукурузы с боливийским типом цитоплазматической мужской стерильности, выращенных при различных концентрациях NaCl.

Засоление, является одним из самых серьезных экологических факторов, ограничивающих производительность культурных растений, в том числе и хлебных злаков [1]. В Казахстане также имеются обширные области с высоким содержанием солей в почвах, и это в первую очередь связано с Аральской проблемой и с землями подверженными процессам вторичного засоления.

Осмотический шок, вызванный высоким уровнем NaCl, сопровождается нарушением водного баланса, снижением тургорного давления, закрытием устьиц, угнетением фотосинтеза и в конечном итоге приводит к разрушению мембран и гибели организма [2]. Под воздействием солевого стресса происходит усиленное образование АФК (активных форм кислорода), таких как O₂⁻ и H₂O₂. В тоже время, растительная клетка обладает мощной и глубоко эшелонированной системой антиоксидантной защиты, куда входят такие ферменты как супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазы, а также ферментативные механизмы защиты, как увеличение содержания α-токоферола, аскорбата и др [3].

На сегодня, одним из многообещающих подходов для снятия стресса и улучшения прорастания семян, в том числе, и при засолении, является предпосевная обработка семян (прайминг) органическими и неорганическими компонентами, стимулирующими рост растений и снижающими эффект действия солей. В наших исследованиях для предварительной обработки семян и снижения уровня действия солевого стресса мы использовали биологически активные препараты, полученные из биогумуса.

Как известно, самоопыленные линии кукурузы с различными типами цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), используются в современной селекции для получения устойчивых и продуктивных гибридов. Поэтому в работе в качестве объекта исследований были использованы самоопыленные линии кукурузы с признаком ЦМС, полученные в отделе кукурузы НИИ земледелия и растениеводства МСХ РК.

Целью работы являлось изучение влияния прайминга семян на изменение активности ферментов - супероксиддисмутазы (СОД) и пероксидазы (ПО) у линии кукурузы с боливийским типом стерильности при действии различных концентраций соли NaCl, для оценки роли в формировании механизмов устойчивости к засолению.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований использовали самоопыленные линии кукурузы с Боливийским типом стерильности (Киз70С) и фертильные линии (сорт Казахстанская 58) не несущий признака ЦМС. Семена обрабатывали в течение 24 часов в 5% водной вытяжке биогуруса и щелочной вытяжке биогуруса «Гумистар», затем выращивали в чашках Петри по 20 семян при 0,1М и 0,17М NaCl. Проростки выращивали при температуре +25°C, освещенность 2 000 Лк с 16-часовым фотопериодом. В качестве контроля использовали необработанные семена и проростки этих же линий кукурузы, выращенные на дистиллированной воде.

Для определения активности ферментов в корнях и листьях использовали 10-дневные проростки кукурузы. Пероксидазную активность определяли по общепринятому методу [4]. Электрофоретическое фракционирование изоферментов СОД и активность определяли по методу [5].

Результаты и их обсуждение

В растениях под действием различных стрессов происходит ряд биохимических изменений, приводящих к повышению интенсивности процессов образования свободных радикалов. В связи, с чем у растений наблюдали повышение активности антиоксидантной защитной системы [6], ферментом которой является супероксиддисмутаза (СОД).

Супероксиддисмутаза вместе с другими компонентами антиоксидантной системы помогает клетке снизить эффект токсического действия свободных радикалов – повреждение мембран клеток, инактивация ферментов, разрыв цепей ДНК. СОД присутствует практически во всех клетках растений и катализирует реакцию дисмутации супероксидного радикала (O_2^-) до O_2 , регулируя тем самым внутриклеточную концентрацию свободных радикалов кислорода.

На рисунке 1 представлены результаты экспериментов по изучению влияния прайминга семян на активность супероксиддисмутазы в листьях и корнях 10-дневных проростков кукурузы в условиях засоления 0,1М и 0,17 М NaCl.

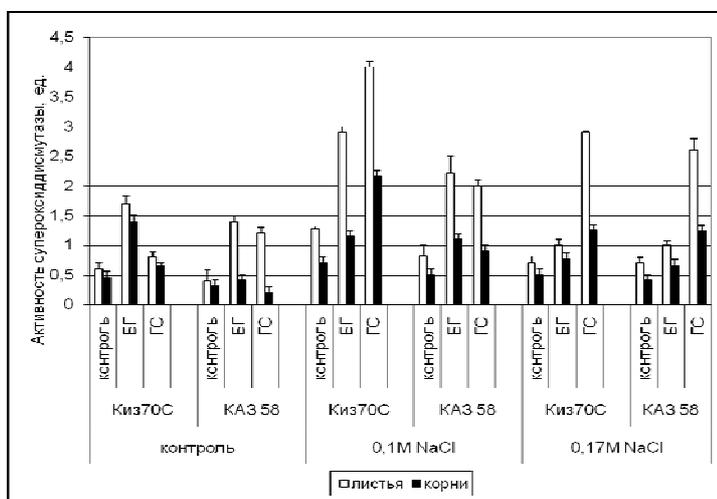


Рисунок 1 - Влияние прайминга водной вытяжкой биогуруса (БГ) и «Гумистаром» (ГС) на активность супероксиддисмутазы в листьях и корнях проростков кукурузы с боливийским типом ЦМС при различных концентрациях NaCl

Анализ полученных данных показал, что активность СОД в корнях оказалась значительно ниже, чем в листьях. Например, в проростках, полученных из семян Казахстанской 58, обработанных 5% ВВБ в контрольных условиях в листьях активность СОД составила $1,4 \pm 0,2$, а в корнях $0,4 \pm 0,1$, т.е. в 3 раза меньше.

На рисунке отражено влияние прайминга, который повышает активность СОД в условиях засоления. Так, при 0,1М засолении прайминг семян Киз70С раствором «Гумистара» увеличивал активность СОД более чем в 4 раза по сравнению с контролем ($4 \pm 0,12$ и $0,8 \pm 0,1$). Аналогичная картина характерна для семян контрольной линии Казахстанская 58, где активность фермента составила $2,0 \pm 0,1$ и $0,8 \pm 0,2$, соответственно.

С увеличением концентрации соли до 0,17М NaCl в среде, активность СОД снижалась. Если, при 0,1М засолении активность фермента у линии Киз70С составляла $1,27 \pm 0,1$ ед., то при 0,17М засолении была $0,7 \pm 0,1$.

Однако, заметное стимулирующее действие прайминга семян на активность фермента и при усилении засоления сохранялось. У сорта Казахстанская 58 в листьях повышение активности наблюдалось от $0,7 \pm 0,1$ до $1 \pm 0,1$ (прайминг ВВБ) и $2,6 \pm 0,1$ (прайминг «Гумистаром»).

На рисунке 2 представлена электрофореграмма СОД, выделенной из листьев, где активность супероксиддисмутазы отмечена во всех образцах кукурузы. При этом у стерильной линии Киз70С

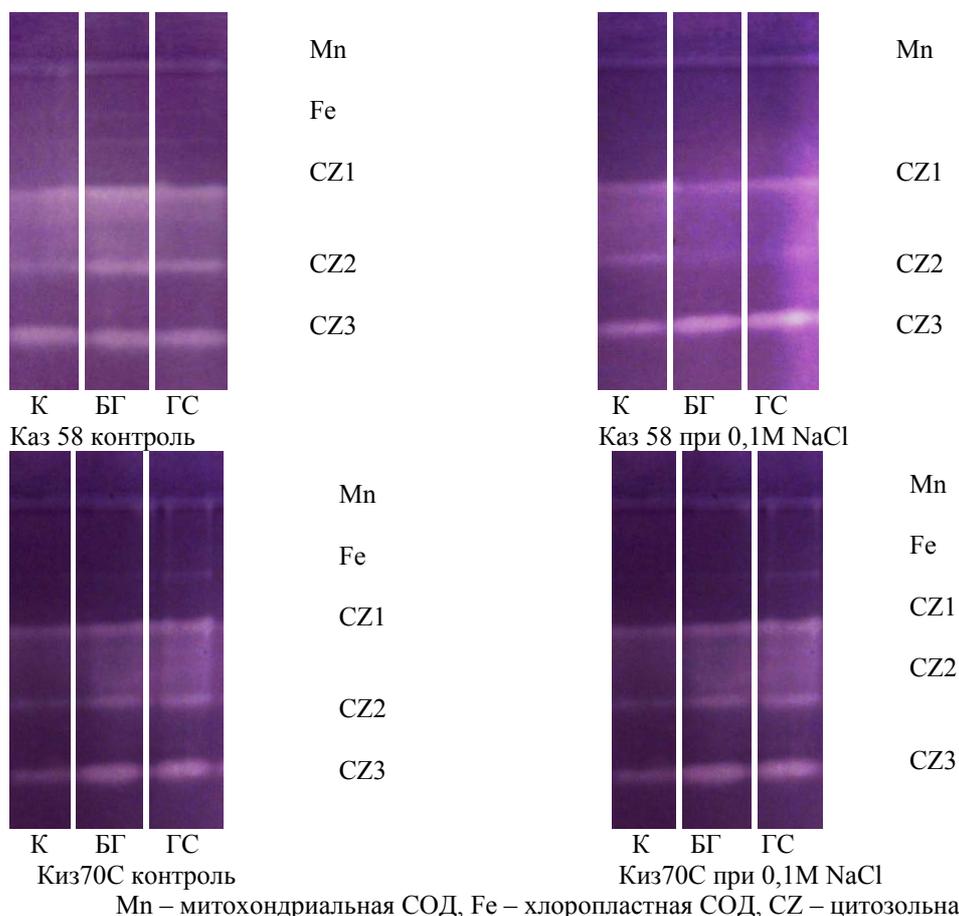


Рисунок 2 – Влияние прайминга водной вытяжкой из биогумуса (БГ) и «Гумистаром» (ГС) на активность изоферментов супероксиддисмутазы, выделенной из листьев кукурузы

наблюдали присутствие митохондриальной, хлоропластной и трех цитозольных изоформ фермента в листьях проростков, выращенных и при засолении и в контроле. Однако, в листьях проростков Казахстанской 58, выращенных при засолении, FeСОД (хлоропластная) изоформа отсутствует.

Прайминг семян биологически активными препаратами из биогумуса увеличивал количество цитозольной изоформы СОД (CZ3), что оказалось характерно для обеих исследованных линий в условиях проведения эксперимента. Также при засолении увеличивалось количество CZ3СОД изоформы, что хорошо видно на электрофореграмме сорта Казахстанская 58.

Электрофоретическое фракционирование СОД, выделенной из корней проростков Киз70С, показало что, во-первых, количество фермента в корнях заметно меньше, чем в листьях и во-вторых, FeСОД изоформы в исследуемых образцах не выявлены (рисунок 3).

При этом митохондриальная изоформа СОД в корнях оказалась более чувствительной к предобработке семян и засолению, т.к. заметно увеличивалась площадь зоны на электрофореграмме.

Таким образом, исходя из полученных результатов, можно заключить, что активность СОД в листьях была выше, чем в корнях 10-дневных проростков кукурузы изученных линий. Воздействие солевого стресса и предварительная обработка семян кукурузы активизировала работу супероксиддисмутазы, преимущественно за счет CZ3 СОД изоформы в листьях и MnСОД изоформы в корнях.

На основании полученных данных можно предположить, что увеличение активности СОД при солевом стрессе не является отражением деструктивных катоболических процессов, а имеет защитно-адаптационное значение. Увеличение активности фермента свидетельствует об адаптации растений кукурузы к засолению.

В работах многих исследователей указывается, что влияние различных неблагоприятных факторов (засуха, засоление, температура) увеличивает активность СОД и других антиоксидантных ферментов в тканях и клетках растений, что свидетельствует об их адаптации. Бараненко В.В. [3] в своей работе показал, что

устойчивые растительные организмы имеют более высокие уровни активности ферментов антиоксидантов, т.е. более эффективную систему защиты.

Как уже было отмечено, к антиоксидантным ферментам также относится пероксидаза, которая характеризуется полифункциональностью, обусловленной как молекулярной гетерогенностью, так и способностью расщеплять большое количество субстратов. Имеющиеся экспериментальные данные подтверждают ее активность при очень многих изменениях и нарушениях метаболизма растений, а некоторые изоэнзимы в ответ на стресс синтезируются *de novo*. В последние годы все чаще появляются работы, в которых авторы предлагают использовать уровень активности и спектр изоэнзимов пероксидазы как диагностический признак устойчивости растений к стрессовым факторам [7].

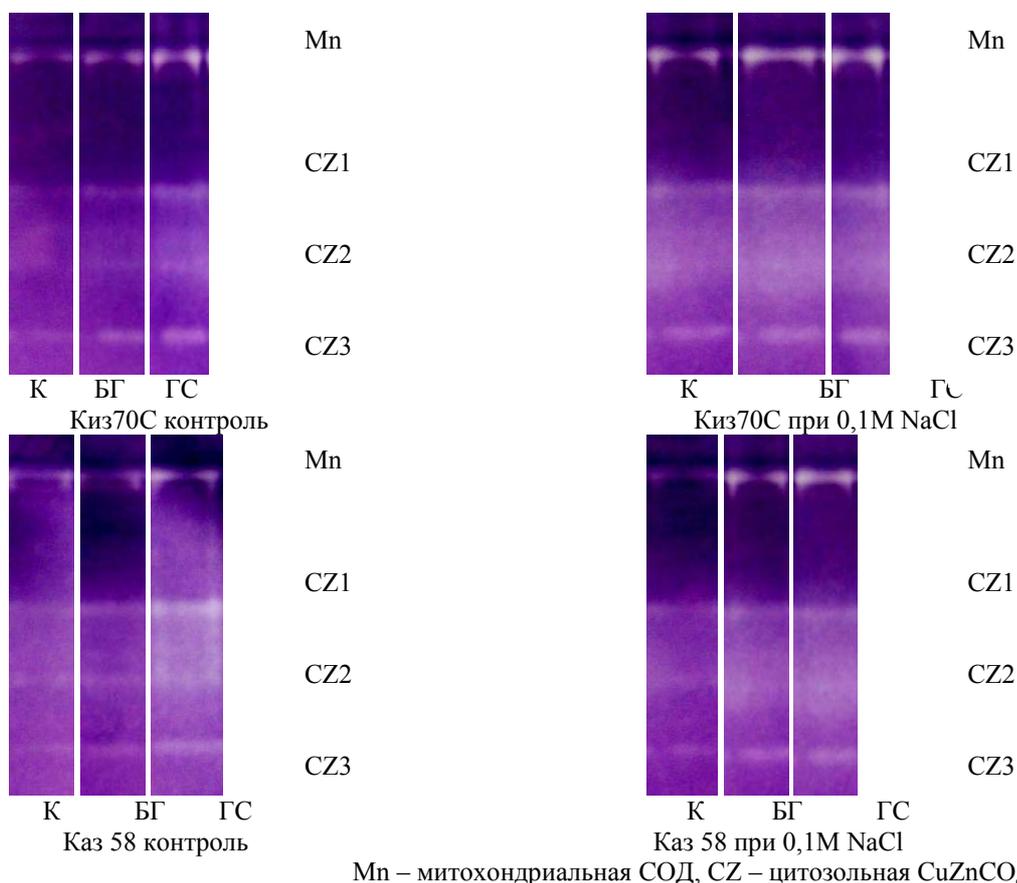


Рисунок 3 – Влияние прайминга водной вытяжкой биогумуса (БГ) и «Гумистаром» (ГС) на активность изоферментов супероксиддисмутазы, выделенной из корней кукурузы

На рисунке 4 представлены результаты экспериментов.

Удельная активность пероксидазы в корнях оказалась выше, чем в листьях. К примеру, в контрольных условиях активность пероксидазы в листьях Казахстанской 58 составила $37,0 \pm 7,0$, а в корнях $135,0 \pm 3,2$, т.е. почти в 3,6 раза выше.