

**ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ЭТИЛЕНПРОДУЦЕНТОВ
НА АКТИВНОСТЬ ФОСФОФРУКТОКИНАЗЫ ПРИ СОЗРЕВАНИИ
ЯБЛОК В МОДЕЛЬНЫХ ОПЫТАХ****Я.А.ОМАРОВ, С.Г.ГЮЛЬАХМЕДОВ, А.А.КУЛИЕВ*****Бакинский Государственный Университет***

Изучено влияние этрела (1 г/л) и гидрела (1 г/л) на активность ФФК при созревании плодов яблони в модельных опытах. В обоих исследованных сортах яблок этиленпродуценты повышали активность фермента. В плодах Антоновки стимулирующий эффект гидрела был обнаружен на 5 дней раньше эффекта этрела. Исследовано влияние этрела и гидрела на активность ФФК в дисках паренхимной ткани яблок. Инкубационная среда угнетала ФФК во всех вариантах. Наименьшая степень угнетения ФФК в дисках обнаружена в варианте с гидредом (на 15%). В контрольном варианте активность фермента понизилась на 57%.

АТФ-зависимая фосфофруктокиназа (ФФК, КФ 2.7.1.11) катализирует первую необратимую реакцию окисления глюкозы по гликолитическому пути – превращение фруктозо-6-фосфата (Ф6Ф) во фруктозо-1,6-дифосфат (Ф1,6ДФ). Она считается ключевым ферментом гликолиза в микроорганизмах, дрожжах и растительных, и животных тканях [1-4]. В отличие от перечисленных объектов, ФФК в сочных плодах растений изучена относительно слабо, а в плодах яблони – практически не исследована. Кроме того, данные, накопившиеся по сей день относительно изучения исследуемой киназы в растениях, противоречат друг другу. Все перечисленное послужило причиной изучения ФФК в плодах яблони.

Как известно, инициация созревания в климактерических плодах связана с наступлением дыхательного климактерического периода, что сопровождается заметным увеличением дыхания. Такое увеличение дыхания следует непосредственно за массовым превращением крахмала до моноз [5]. Контроль инициации дыхательного климактерического периода необходим для увеличения срока хранения климактерических плодов.

Моделирование процессов созревания позволяет в значительной степени выравнивать полученные результаты, искаженные неравномерностью роста и развития, а, следовательно, различием в физиологическом состоянии плодов. Кроме того, моделирование позволяет преодолеть ряд проблем, связанных с сезонностью этих биологических объектов. Моде-

лирование созревания может осуществляться как с использованием целых плодов, так и дисков их тканей [6].

В предыдущей работе, мы уже сообщали о получении ферментного препарата из субэпидермальной ткани плодов яблоки сортов Антоновка и Ренет Симиренко [7]. Цель данной работы - изучить динамику изменения активности ФФК при созревании плодов яблоки, стимулируемого этилен-продуцентами в модельных опытах.

Методика

Объектами исследования служили плоды яблок (*Pyrus Domestica* Borkh.) двух сортов – Антоновка и Ренет Симиренко. Плоды яблок собирали на преклимактерической стадии созревания и хранили до экспериментов в холодильнике при +4°C. Были отобраны плоды приблизительно одинакового размера и без видимых дефектов. Опыты проводили со стандартными дисками диаметром 10 мм и толщиной 1 мм, приготовленными из субэпидермальной ткани плодов.

Инкубацию дисков проводили в чашках Петри. В качестве инкубационной среды использовали 0,35 М манит, 0,35 сахарозу, 0,1 М фосфатный буфер, рН 5,6, а также дистиллированную воду, которая служила контролем. Для предотвращения бактериального загрязнения во все растворы добавляли хлорамфеникол в концентрации 50 мг/мл.

Плоды обрабатывались водным раствором этилена и гидрела в концентрации 1 г/л.

Параллельно определяли также активность ферментов в других модельных опытах, но с целыми плодами. Такое моделирование достигалось переносом, находившихся на холоду, яблок в комнатные условия. Эти эксперименты были необходимы для сопоставления результатов разного типа моделирования и оценки степени пригодности подобранных условий инкубации для изучения активности ФФК при созревании плодов яблоки.

Приготовление ферментного препарата ФФК и определение ее активности осуществили, как описано ранее [7]. Белок определяли по Бредфорду в супернатанте, выделенный без добавления БСА. Концентрацию белка рассчитали по калибровочной кривой построенной по БСА [8].

Эксперименты по определению активности ФФК проводились как в естественных условиях созревания, так и стимулированием синтетическими этиленпродуцентами.

Результаты и обсуждение

Результаты по определению изменения общей активности ФФК плодов яблоки сорта Антоновка в модельных опытах с применением целых плодов яблоки под действием этилена и гидрела в течение всего периода наблюдений представлена на рис.1. Как видно из графика, активность ФФК в контрольных плодах имеет тенденцию к увеличению. Так, в первые 10 дней наблюдается некоторый подъем в ферментативной активнос-

ти исследуемого фермента. На 20 день данное увеличение в активности фермента становится более выраженным, однако своего максимума ферментативная активность ФФК достигает на 30 день. Выявляемая на 30 день максимальная активность ФФК на 35 % выше первоначального значения.

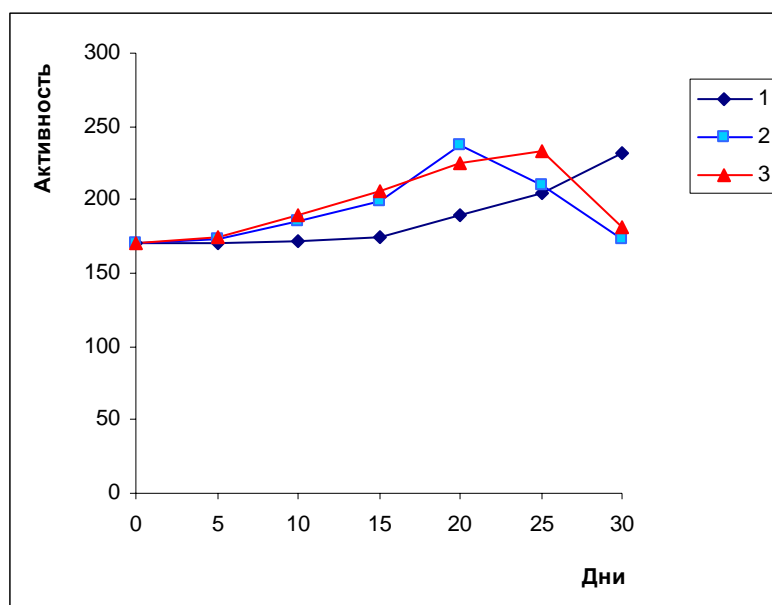


Рис.1. Изменение активности ФФК при созревании плодов яблони сорта Антоновка, обработанных этиленпродуцентами в модельных опытах (Активность фермента выражали в нмоль НАДН·мин⁻¹·мг⁻¹белка).
1. Контроль; 2. Гидрел; 3. Этрел.

В экспериментах же с этиленпродуцентами, начало дыхательного климактерического периода по сравнению с контрольными плодами происходит значительно раньше. Так, при обработке этрелом активность ФФК начинает увеличиваться уже на пятый день экспериментов, после чего активность продолжает увеличиваться и достигает своего максимального значения на 25 день после обработки плодов этиленпродуцентом. В последующие дни наблюдается постепенное снижение активности ФФК. При обработке же гидрелом также наблюдается постепенное увеличение активности исследуемого фермента. Следует отметить, что, проводя сравнительный анализ экспериментов с обработкой плодов яблони двумя типами этиленпродуцентов, видно, что активность фермента начинает увеличиваться раньше при обработке гидрелом, чем этрелом и достигает своего максимального значения не на 25 день, как в случае с этрелом, а на 20 день. Однако этрел вызывает большую стимуляцию ферментативной активности ФФК нежели гидрел. Эксперименты, проведенные с плодами

яблони сорта Ренет Смиренко выявили аналогичную картину влияния использованных этиленпродуцентов на активность фосфофруктокиназы.

Следующая серия экспериментов была проведена в модельных опытах с применением дисков из субэпидермальной ткани плодов яблони обоих сортов. Как показали проведенные эксперименты, при обработке дисков этиленпродуцентами после незначительного увеличения активности ФФК, которое происходит в первые часы, наблюдалось постепенное уменьшение ферментативной активности и продолжалось в течении всего периода эксперимента (рис.2). Сравнивая результаты, полученные в экспериментах с этрелом, гидрелом и контролю, видно, что при обработке дисков этиленпродуцентами, после незначительного увеличения (на 2 %) активности ФФК, наименьший спад в активности наблюдается у гидрельного варианта (на 15% от первоначального значения активности фермента). Для этрельного варианта эта разница выше и составляет 26% от первоначального значения активности фермента. При обработке же дисков этрелом в первые часы также наблюдается незначительное снижение активности исследуемого фермента, но дальнейшая обработка данным этиленпродуцентом приводит, относительно гидрельного варианта, к более сильному торможению активности.

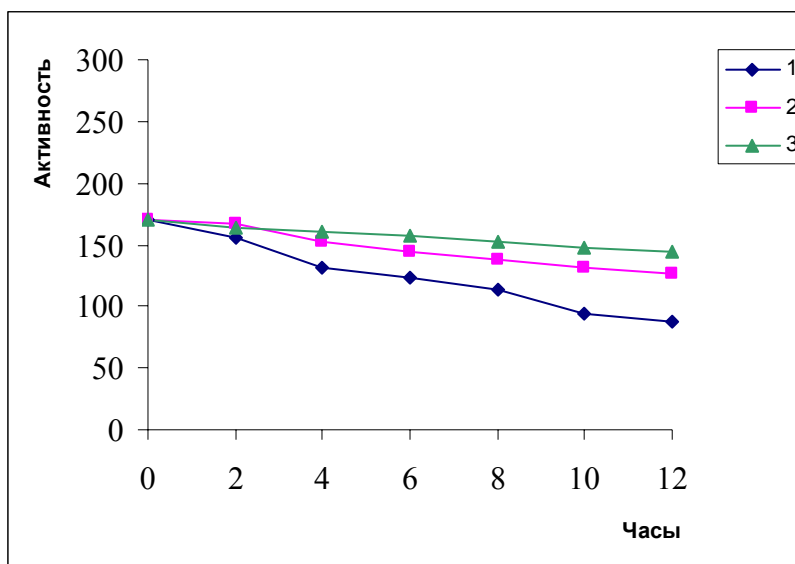


Рис.2. Изменение активности ФФК при созревании в дисках плодов яблони сорта Антоновка, обработанных этиленпродуцентами (Активность фермента выражали в нмоль НАДН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка).
1. Контроль; 2. Гидрел; 3.Этрел.

Активность ФФК в необработанных дисках (контроль), в отличие от обработанных этиленпродуцентами, начинает понижаться уже в первые

часы после обработки. Из этих трех экспериментов самое минимальное значение (на 57%) активности ФФК наблюдается в данных экспериментах. Эксперименты, проведенные с плодами яблони сорта Ренет Симиренко выявили похожую картину влияния использованных этиленпродуцентов на активность фосфофруктокиназы. Данные эксперименты показали, что, несмотря на уменьшение ферментативной активности в обработанных и необработанных плодах, все же относительно небольшое снижение активности ФФК у обработанных плодов дает основание предположить, что использованные этиленпродуценты стимулируют исследуемый фермент.

Таким образом, при ускорении процессов созревания синтетическими этиленпродуцентами наблюдается очевидное повышение активности ФФК и преждевременное созревание, т.е. начало климактерического дыхательного периода, которое вызвано продуцированным этиленом. В литературе встречаются сообщения об увеличении активности ФФК при созревании сочных плодов, а также при развитии других растительных объектов. Так в экспериментах, проведенных с плодами бананов, выявлено заметное увеличение удельной активности ФФК [5], аналогичное происходит также в плодах груши [9]. Сообщается также и о существенном увеличении активности ФФК и при образовании клубней, так называемом процессе туберизации [10]. Однако в литературных источниках не удалось встретить данные, касающиеся исследования влияния этрела и гидрела на активность ФФК, но имеются данные, по которым обработка сочных плодов, в частности яблок, синтетическими этиленпродуцентами по разному сказывается в функционировании других ферментных систем. Так, например, этрел и гидрел в концентрации 0,5 г/л стимулировали активность ключевого фермента пентозофосфатного пути глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [11]. О роли гормонального контроля созревания климактерических плодов отмечается также и в работе [12]. Стимулирование функционирования ФФК, возможно связано с тем, что в период созревания яблок увеличивается потребность в АТФ, а также уменьшение количества промежуточного продукта гликолитического пути – ФЕП-а, который является, как известно, ключевым регулятором данного фермента [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Flores C.L., Martínez-Costa O.H., Sánchez V., et al. The dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* possesses an atypical phosphofructokinase: characterization of the enzyme and its encoding gene // *Microbiol.*, 2005, V.151, p.1465-1474.
2. Kimmel J.L. and Reinhart G.D. Reevaluation of the accepted allosteric mechanism of phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus* // *PNAS*, 2000, V.97, Is.8, p.3844-3849.
3. Hervant F. The activity of enzymes associated with glycolysis, Krebs cycle and energy metabolism in hypogean and epigean crustaceans. *C.R. Acad. Sci.*, 1996, V.319, p.1071-1077.
4. Plaxton W.C. The organization and regulation of plant glycolysis // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1996, V.47, p.185-214.

5. Turner W.L., Plaxton W.C. Purification and characterization of pyrophosphate- and ATP-dependent phosphorfructokinases from banana fruit // *Planta*, 2003, V.217, p.113–121.
6. Мамедов З.М., Кулиев А.А., Гюльяхмедов С.Г., Салькова Е.Г. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1998, т.34, №2, с.196-198.
7. Гюльяхмедов С.Г., Омаров Я.А., Джалилова Т.А. // *Журн. Бильги. Сер. Химия, биология, медицина*. Баку. 2004. т.21, №5. С.53-55.
8. Bradford M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*, 1976, V.72, p.248-254.
9. Appeldoorn N.J.G., de Bruijn S.N., Koot-Gronsveld E.A., et al. Developmental changes in enzymes involved in the conversion of hexose phosphate and its subsequent metabolites during early tuberization of potato // *Plant, Cell and Environ.*, 1999, V.22, p.1085-1096.
10. Nanos G.D., Romani R.J., and Kader A.A. Respiratory metabolism of pear fruit and cultured cells exposed to hypoxic atmospheres: associated change in activities of key enzymes // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1994, V.119, № 2, p.288–294.
11. Кулиев А.А., Гюльяхмедов С.Г., Мамедов З.М. Влияние этрела и гидрела на основные НАДФ-Н-генерирующие ферменты плодов яблони. // Тезисы докладов III конференции Всероссийского общества физиологов растений. С-Петербург. 1993, с.67.
12. Vendrell M. and Palomer X. Hormonal control of fruit ripening in climacteric fruits // *Acta Hort. (ISHS)*, 1998, V.463, p.325-334.

**ALMALARIN YETİŞMƏSİ ZAMANI MODEL TƏCRÜBƏLƏRDƏ
FOSFOFRUKTOKİNAZANIN FƏALLIĞINA SİNTETİK
ETİLENPRODUSENTLƏRİN TƏSİRİ**

Y.A.ÖMƏROV, S.Q.GÜLƏHMƏDOV, A.Ə.QULİYEV

XÜLASƏ

Model təcrübələrdə FFK-nın fəallığına alma meyvələrinin yetişməsi zamanı etrel (1 q/l) və hidrelin (1 q/l) təsiri öyrənilmişdir. Almaların hər iki öyrənilmiş sortlarında etilenprodusentlər fermentin fəallığını artırır-dı. Hidrelin stimullaşdırıcı təsiri Antonovkanın meyvələrində, etrellə mü-qayisədə 5 gün tez aşkarlanırdı. Almaların parenxim toxumasının disklə-rində FFK-nın fəallığına hidrel və etrelin təsiri öyrənilmişdir. İnkubasiya mühiti bütün variantlarda FFK-nın fəallığını tormozlayırdı. Disklərdə FFK tormozlanması ən zəif dərəcəsi (15%) hidrellə aparılan variantda müşahidə olunur. Kontrol variantında fermentin fəallığı 57% aşağı dü-şür.

**THE EFFECT OF THE ETHYLENPRODUCENTS ON THE ACTIVITY
OF THE PHOSPHOFRUCTOKINASE OF APPLE FRUITS DURING
THE RIPENING IN MODEL EXPERIMENTS**

Y.A.OMAROV, S.G.GYULAKHMEDOV, A.A.GULIYEV

SUMMARY

The effect of the ethrel (1 g/l) and the hydrel (1 g/l) on the activity PFK during the ripening fruits in model experiments has been studied. The ethylenproducents increased the activity of the enzyme in both investigated varieties. The activated effect of the hydrel was revealed 5 days before than the ethrel. The effect of the ethrel and hydrel on the activity PFK in discs of parenchyma tissue of apple fruits has been investigated. An incubational medium suppressed PFK in all variants. The least degree of the suppression of the activity was revealed in the hydrel variant by 15%. The activity of the enzyme in the control variant decreased.