



## ХИМИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ДРЕВЕСИНЫ

УДК 630\*181.324

***П.В. Миронов, Е.В. Алаудинова, Ю.С. Шимова, С.М. Репях***

Миронов Петр Викторович родился в 1950 г., окончил в 1973 г. Красноярский государственный университет, доктор химических наук, профессор кафедры химической технологии древесины и биотехнологии Сибирского государственного технологического университета. Имеет более 60 печатных работ в области проблем криобиологии и биотехнологии.



Алаудинова Елена Владимировна родилась в 1955 г., окончила в 1978 г. Сибирский технологический институт, кандидат химических наук, доцент кафедры химической технологии древесины и биотехнологии Сибирского государственного технологического университета. Имеет более 20 печатных работ в области экологии, биохимии растительной клетки, биотехнологии.



Шимова Юлия Сергеевна родилась в 1977 г., окончила в 1999 г. Сибирский государственный технологический университет, аспирант кафедры химической технологии древесины и биотехнологии Сибирского государственного технологического университета. Имеет около 20 печатных работ в области экологии и биохимии растительной клетки.



Репях Степан Михайлович родился в 1937 г., окончил в 1966 г. Сибирский технологический институт, доктор химических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой химической технологии древесины, проректор по научной работе Сибирского государственного технологического университета, академик МАН ВШ и РАЕН. Имеет более 300 научных работ в области химии древесины, экологии, биохимии.



## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРИОЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ МЕРИСТЕМ ЗИМУЮЩИХ ПОЧЕК ЕЛИ И ПИХТЫ

Исследованы антифризные свойства водорастворимых белков меристем почек ели и пихты. Исследованы гидрофильные свойства периферического белка мембран на примере меристематических тканей почек ели. Установлена роль исследованных белков в процессе низкотемпературной адаптации растений.

*Ключевые слова:* почки ели и пихты, меристематические ткани, низкотемпературная адаптация, периферические белки, интегральные белки, водорастворимые белки, антифризные свойства.

Методами термического анализа в работе [2] показано, что в процессе охлаждения побегов с почками лиственницы, ели и пихты регистрируются низкотемпературные экзотермы (НТЭ), связанные с кристаллизацией переохлажденной внутриклеточной воды в меристематических тканях.

Способность к глубокому переохлаждению – важнейшее свойство, обеспечивающее клеткам и тканям в целом возможность обезвоживания при образовании внеклеточного льда. При относительно небольших скоростях снижения температуры (до 5 °С/ч) лед образуется преимущественно в специальных зонах льдообразования – полостях, расположенных в основании почек; при постепенном притоке к ним переохлажденной воды из клеток и тканей меристем.

Движущей силой миграции переохлажденной воды к зонам льдообразования является разность химических потенциалов льда и внутриклеточной воды, возникающая вследствие различий в давлении паров воды над льдом и внутриклеточными растворами. Величина переохлаждения определяется как разность температур плавления и кристаллизации. Несмотря на то, что примордии в почках имеют относительно небольшие размеры (как правило, около 1 мм в диаметре), при достаточно высоких скоростях охлаждения (10 ... 20 °С/ч и выше) скорость обезвоживания тканей оказывается недостаточной и переохлажденная вода в клетках может замерзать, что регистрируется в виде НТЭ. Если же достигается уровень обезвоживания, соответствующий термодинамическому равновесию со льдом при – 17 ... 20 °С (остаточное содержание воды около 0,5 г/г абс. сухой массы), то оставшаяся вода в клетках может сохраняться в переохлажденном состоянии вплоть до температур гомогенного зародышеобразования (вплоть до – 80 °С).

В работах [1–3] показано, что способность к глубокому переохлаждению внутриклеточной воды в тканях лиственницы обусловлена свойствами водорастворимых веществ клеток меристем, в том числе водорастворимыми белками цитоплазмы, которые обладают повышенной антинуклеационной активностью: водные растворы белка замерзают со значительным переохлаждением (до 12 ... 15 °С) по сравнению с образцами низкомолекулярных растворимых веществ (всего 3 ... 4 °С).

В меньшей степени изучены антинуклеационные свойства водорастворимых белков меристем почек ели и пихты, в которых, как и в почках лиственницы, внутриклеточная вода может находиться в состоянии глубокого переохлаждения. В связи с этим в данной работе продолжено изучение некоторых физико-химических свойств водорастворимых белков цитоплазмы меристем почек ели и пихты, в частности влияние низко- и высокомолекулярных фракций водорастворимых белков на степень переохлаждения их водных растворов, а также влияние ферментов (пептидаз) и термического воздействия (нагревание до 100 °С) на антинуклеационную активность этих белков.

Для оценки переохлаждения растворов применяли эмульсионную методику [4], позволяющую исключить влияние центров гетерогенного зародышеобразования на процесс кристаллизации и достичь максимально возможного переохлаждения. В этом случае растворы в каплях эмульсии (типа вода в масле) будут замерзать по механизму гомогенного зародышеобразования, поскольку центры гетерогенной кристаллизации, как правило, всегда присутствующие в малом количестве в воде и водных растворах, будут изолированы в небольшом числе капель.

На рис. 1 приведены результаты определения методом дифференциально-термического анализа температуры гомогенной нуклеации льда в растворах различных веществ в микрокаплях эмульсии (средний диаметр капель около 2 мкм). Наибольшее переохлаждение обеспечивает фракция высокомолекулярных водорастворимых белков цитоплазмы меристем почек ели и пихты; с меньшим переохлаждением замерзают растворы суммарного водорастворимого белка, с еще меньшим – растворы низкомолекулярных фракций (молекулярные массы ниже 80 кД). В то же время даже низкомолекулярные белки обладают более высокой антинуклеационной активностью по сравнению с суммарной фракцией водорастворимых веществ цитоплазмы (включающей белки) и фракцией низкомолекулярных веществ.

Белковая природа антинуклеационного фактора подтверждается обработкой образцов суммарной фракции водораство-

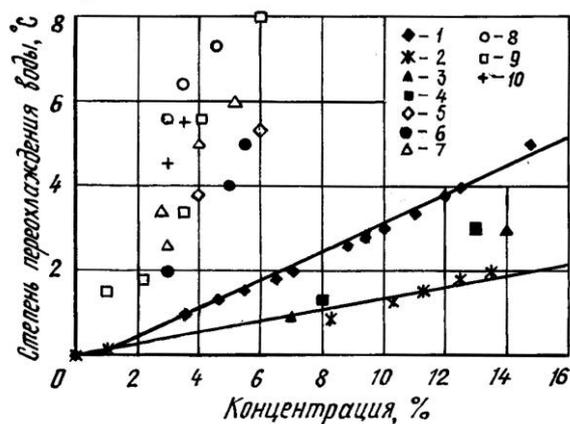


Рис. 1. Зависимость степени переохлаждения воды от концентрации растворенных веществ: 1, 2 – суммарная фракция водорастворимых веществ и низкомолекулярные вещества цитоплазмы меристем почек ели; 3, 4 – обработанные термически и пептидазами суммарные фракции водорастворимых веществ; 5, 6 – низкомолекулярные фракции белков цитоплазмы меристем почек пихты и ели; 7, 9 – суммарный водорастворимый белок меристем почек пихты и ели; 8, 10 – высокомолекулярные фракции водорастворимых веществ и белков цитоплазмы меристем почек ели

римых веществ цитоплазмы ферментом пептидазой, разрушающей белки (добавление к образцу ферментного препарата с концентрацией 1 мг/мл и инкубация в течение 2 ч). Такая обработка значительно снижает антинуклеационную активность: степень переохлаждения воды в данных образцах становится более характерной для растворов низкомолекулярных веществ. Нагревание до 100 °С в течение 1 мин суммарной фракции водорастворимых веществ также приводит к снижению антинуклеационной активности (рис. 1).

Таким образом, водорастворимые белки цитоплазмы меристем почек ели и пихты, как и аналогичные белки лиственницы, обладают антинуклеационным действием, которое выражается в ингибировании образования устойчивых зародышей льда в их водных растворах и, как следствие, приводит к снижению температуры замерзания.

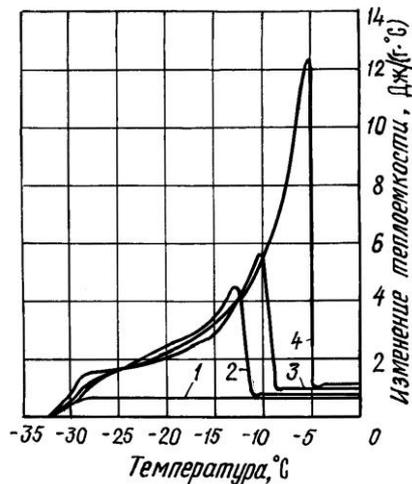
В работе [2] показано, что весной содержание водорастворимого и периферического белков возрастает и достигает значений, превышающих среднезимний уровень. В этот же период быстро увеличивается содержание воды в клетках меристем (набухание почек) и температура кристаллизации внутриклеточной воды. Однако даже при содержании воды в меристемах до 250 ... 300 % определенная способность к переохлаждению все еще сохраняется: температура начала замерзания внутриклеточной воды в это время составляет около -20 ... -22 °С. Содержание воды в меристемах зимой в условиях полного оттаивания почек составляет 1,2 ... 1,4 г/г абс. сухого материала. Совпадение весеннего повышения содержания белка с увеличением содержания воды, по-видимому, можно объяснить необходимостью дополнительной защиты клеток от внутриклеточного замерзания при вероятных в это время заморозках.

В момент весеннего максимума содержания водорастворимого белка цитоплазмы его фракционный состав существенно меняется [2], однако эти белки все еще обладают определенной антинуклеационной активностью, соответствующей активности низкомолекулярных белков цитоплазмы зимующих меристем (рис. 1).

Наименее устойчивыми структурами клеток при низкотемпературном обезвоживании (при оттоке переохлажденной внутриклеточной воды к внеклеточным зонам льдообразования) являются клеточные мембраны. Предполагается, что одной из основных причин повреждений мембран служит их дегидратация при низких температурах. Существенная роль в защите биологических мембран от дегидратации отводится периферическим мембранным белкам [1, 2].

В работе [1] приведены результаты изучения криозащитных свойств периферических белков комплекса клеточных мембран меристем почек лиственницы. Установлено, что периферические белки мембран, как и водорастворимые белки цитоплазмы, обладают антинуклеационными свойствами. Эти свойства проявляются в том, что периферические белки формируют на поверхности мембран однородный гидрофильный слой, обеспечивающий инактивацию существующих на мембранах неоднородностей, которые мо-

Рис. 2. Температурная зависимость изменения теплоемкости в образцах выделенного из клеточных мембран меристем почек ели периферического белка с различным содержанием воды: 1 – 0,30 г/г; 2 – 0,40; 3 – 0,45; 4 – 0,70 г H<sub>2</sub>O/г абс. сухой массы



гут служить центрами гетерогенного зародышеобразования. Без подобного слоя глубокое переохлаждение внутриклеточной воды было бы невозможно. Свойства такого слоя, с точки зрения защиты мембран от дегидратации, не изучены.

В связи с этим представляется интересным оценить количество воды, связываемой при различных отрицательных температурах периферическими белками, выделенными из мембран, а также целыми клеточными мембранами и мембранами с удаленным слоем периферических белков. Такие измерения, как известно, можно выполнить методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

На рис. 2 приведены калориметрические кривые размораживания препаратов периферических белков, выделенных из мембранного комплекса меристем почек ели. Плавление льда в образцах начинается с относительно резкого подъема теплоемкости при температуре около  $-30^{\circ}\text{C}$ . Этот прирост, вероятнее всего, связан с расстеклованием гидратированного белка, находящегося при более низкой температуре в стеклообразном состоянии. Затем в широкой области температур регистрируются пики теплопоглощения, связанные с плавлением различных количеств льда.

Для оценки количества связываемой воды при различных температурах в области фазового перехода плавления необходимо по кривым изменения теплоемкости построить температурные зависимости теплопоглощения (в расчете на сухую массу образцов с различным влагосодержанием). Соответствующие кривые приведены на рис. 3, а.

Рассчитав для образцов с различным содержанием воды тепловой эффект и отнеся его к сухой массе образца, можно получить зависимость теплопоглощения от содержания воды в образцах.

На рисунке 3, б приведены соответствующие зависимости для препаратов периферического белка и мембранного комплекса. Точка пересечения полученных прямых с осью абсцисс соответствует количеству связан-

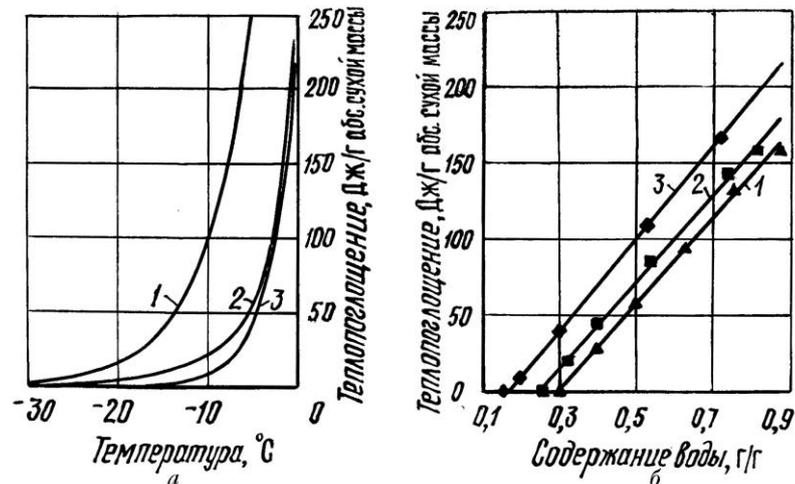


Рис. 3. Зависимость теплопоглощения в области фазовых переходов воды (плавления) в образцах от температуры (а) и содержания воды (б): 1 – периферический белок комплекса клеточных мембран меристем почек ели (суммарная фракция); 2 – комплекс клеточных мембран меристем почек ели; 3 – то же с удаленными периферическими белками

ной невымораживаемой воды. Суммарная фракция белков характеризуется более высоким содержанием невымораживаемой воды по сравнению с препаратами мембранного комплекса.

При удалении периферических белков количество невымораживаемой воды в мембранах становится ниже, чем в нативных. Это свидетельствует о том, что периферические белки обеспечивают защиту мембран от дегидратации.

Пользуясь данными рис. 3, можно определить количество незамерзшей воды, связываемой белками и мембранами при температуре в области  $-30 \dots 0$  °C. Полученные результаты показывают, что именно периферические белки при всех температурах связывают повышенное количество воды, обеспечивая необходимый уровень гидратации мембран.

Температурная зависимость содержания незамерзшей (связанной) воды в различных образцах клеточных мембран меристематических тканей почек ели приведена на рис. 4, анализируя который можно сделать вывод о том, что вторая криозащитная функция периферических белков связана с их способностью препятствовать излишней дегидратации мембран.

Таким образом, приведенные результаты дают основание считать, что именно мембранные белки обеспечивают сохранение нативной структуры биологических мембран при низких температурах.

Как было показано в работе [2], содержание мембранных белков в меристемах почек ели в зимний период достигает 77 % от всей массы мембран (отношение белок : липид равно приблизительно трем). При этом доля

интегральных белков составляет около 51 %, периферических – до 26 % от массы мембран [2].

Несложные расчеты с учетом массовой доли мембран в клетках показывают, что этого количества периферических белков (в предположении о глобулярном строении их основной массы) достаточно для формирования плотного монослоя на поверхности клеточных мембран и образования их внешнего «скелета». Высокое содержание белков, адсорбированных на поверхности клеточных мембран, обеспечивает стабилизацию последних при низких температурах. Механизм такой стабилизации может состоять в следующем: температура начала перехода гидратированных периферических белков мембран в стеклообразное состояние составляет около  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (см. рис. 2). При температурах ниже  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  в результате аморфного затвердевания (стеклования) слоя адсорбированных периферических и, вероятно, интегральных белков структура биомембран фиксируется при условии достаточного уровня обезвоживания клеток и становится нечувствительной к температурному воздействию.

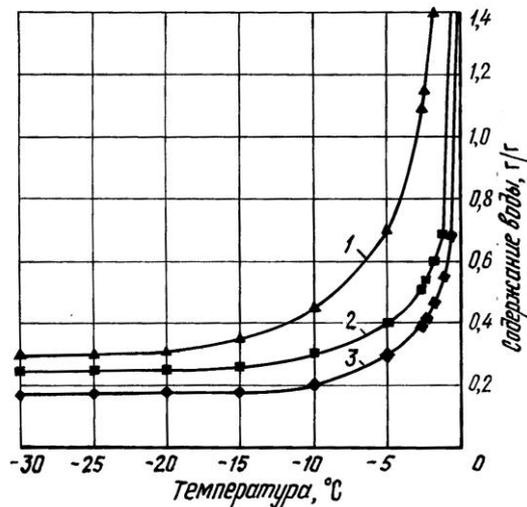


Рис. 4. Зависимость содержания незамерзшей (связанной) воды в образцах от температуры (см. обозначения на рис. 3)

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алаудинова Е.В. Сезонные изменения состава и свойств белков и фосфолипидов меристематических тканей почек лиственницы сибирской: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. – Красноярск, 2000. – 23 с.
2. Миронов П.В., Алаудинова Е.В., Релях С.М. Низкотемпературная устойчивость живых тканей хвойных. – Красноярск, 2001. – 221 с.
3. Миронов П.В., Лоскутов С.Р. Исследование морозостойкости древесных растений, интродуцируемых в дендрарии Института леса СО РАН. 1. Роль белков-криопротекторов в переохлаждении внутриклеточной воды в тканях лиственницы сибирской // Лесн. журн. – 1998. – № 6. – С. 24–29. – (Изв. высш. учеб. заведений).
4. Rasmussen D. N, Loper c. K. DSC: A rapid method for isothermal rate nucleation measurement // Acta Metallurg. – 1976. – Vol. 24. – P. 117–123.

Сибирский государственный технологический университет

Поступила 15.10.02

---

*P.V. Mironov, E.V. Alaudinova, Yu.S. Shimova, S.M. Repyakh*

**Physical-and-chemical Properties of Cryoprotective Proteins of Meristems of Spruce and Fir Wintering Buds**

Antifreezing properties of water-soluble proteins of spruce and fir buds' meristems are studied. Hydrophilic properties of membranes' peripheral protein based on the example of meristem tissues of spruce buds are investigated. The role of proteins under study in the process of low-temperature adaptation of plants is set.

---