

**«НАУКА | RASTUDENT.RU»**

Электронный научно-практический журнал

График выхода: ежемесячно

Языки: русский, английский

ISSN: в процессе присвоения

Учредитель: ИП Соколова А.С.

Издатель: компания INFLASH

Место издания: г. Уфа, Российская Федерация

---

Халиков Р.М., Латыпова З.Б. Разработка фитостероидного биопрепарата: один из подходов уменьшения техногенного прессинга на природные ландшафты// Наука-RASTUDENT.RU. – 2014. – No. 1(1) / [Электронный ресурс] – Режим доступа. – URL: <http://rastudent.ru/nauka/1/1161/>

© Р.М. Халиков, З.Б. Латыпова, 2014

© ИП Соколова А.С., 2014

© INFLASH, 2014

УДК 58.01: 665.3

**Халиков Рауф Музагитович,**

*доцент кафедры химии Башкирского государственного педагогического университета*

**Латыпова Закира Бадретдиновна,**

*доцент кафедры географии и географического образования Башкирского государственного педагогического университета,*

*г. Уфа, Российская Федерация*

## Разработка фитопростаноидного биопрепарата: один из подходов уменьшения техногенного прессинга на природные ландшафты

---

**Аннотация:** Проанализированы экобезопасные технологии использования пестицидов в агроландшафтах. Оптимизирован метод выделения нативных липидов из льняных семян, даны физико-химические характеристика суммарных экстрагируемых компонентов и определены показатели их биологической активности на растениях при предпосевной обработке семян ячменя. На проростках ярового ячменя показана рост- и иммуностимулирующая активность фитопростаноидных оксипитинов из семян льна.

**Ключевые слова:** пестицид, липиды, элиситор, фитопростаноиды, лен, сельскохозяйственные растения, ландшафт.

**ELABORATION OF FYTOPROSTANOID BIOLOGICAL  
PREPARATION: ONE APPROACH REDUCE TECHNOGENIC  
PRESSURE ON THE NATURAL LANDSCAPE**

**Khalikov Rauf Muzagitovich,**

*associate professor of chemistry department of the Bashkir State Pedagogical University, Ufa, Russian Federation*

**Latypova Zakira Badretdinovna,**

*assistant professor of geography and geographic education BSPU*

**Abstract:** Saving technologies analyzed pesticide use in agricultural landscapes. Optimized method for the isolation of native lipids from flax seed, given the physicochemical characteristics of the total extracts and identify indicators of their biological activity in plants preliminary treatment of barley seeds. On seedlings of spring barley shows growth and immunostimulatory activity fytoprostanoid oxylipins from flax seeds.

**Keywords:** pesticide, lipids, elicitor, fytoprostanes, flax, agricultural plants, landscape.

Ежегодно в качестве средств защиты сельскохозяйственных растений от сорняков, вредителей, грибковых и других болезней используются миллионы тонн пестицидов во всей планете. Пестициды (гербициды, инсектициды, фунгициды), применяемые в агропромышленности, являются одним из потенциальных источников загрязнения окружающей среды: почвы, воды, воздуха, населенных мест и продуктов питания. Стойкие пестициды, например, период полураспада ДДТ 15-20 лет, разрушаются медленно, накапливаются живыми организмами и мигрируют по трофическим цепям [1]. Однако применение химических средств защиты растений позволило в 2 раза увеличить продуктивность агрокультур (из-за вредителей, сорняков и болезней в мире теряется до 24% выращенного урожая) и поэтому в современных экономических реалиях нет альтернативы полного отказа от использования пестицидов.

Достаточно эффективными подходами уменьшения пестицидного воздействия на природную среду являются тенденции создания препаратов с низкой дозой и быстрым разложением в биогеоценозах. Для предупреждения возможного вредного влияния средств защиты растений на человека, животных и т.д. необходимо при использовании ядохимикатов учитывать их действие не только на определённого вредителя, но и на биоценозы и предвидеть конечные результаты. Селекция основных возделываемых

культур: пшеницы, ржи, ячменя, картофеля и др. в последние десятилетия шла на отбор генотипов с высокой продуктивностью при одновременном использовании различных пестицидов. Исследование экологичных («зеленых») типов биорациональных пестицидов для контроля численности вредных организмов актуально и требует поиск инновационных методов решения.

Целью настоящей работы была оптимизация методов выделения фитопростаноидных оксипинов из семян льна и оценка физиологических свойств этих биопрепаратов.

В последние годы выявлена важная роль оксипинов – оксигенированных производных непредельных жирных кислот в механизмах защиты растений к патогенам и адаптации к неблагоприятным факторам среды. Так, в работах О.Л.Озерецковской и др. [2] было обнаружено, что арахидоновая кислота представлена в липидной фракции патогенного гриба фитофторы и является высокоэффективным *элиситором* механизмов защиты картофеля и ряда других культур к различным болезням. Клетки растений воспринимают разнообразные сигнальные молекулы (*первичные мессенджеры*) и реагирует на них (физио-, биохимический ответ).

**Биорегуляторы** – это сигнальные химические вещества, вырабатываемые клетками организма (или *экзогенные* молекулы) и влияющие на метаболизм других клеток или целого органа. Всех биорегуляторов отличает высокая биологическая активность (они оказывают воздействие в очень низких концентрациях  $10^{-6}$ – $10^{-10}$  моль/литр и *специфичность* (даже очень близкие по химической структуре аналоги гормонов дают различный эффект).

К биосинтезу физиологически активных веществ потенциально способна любая растительная клетка, но обычно место синтеза и клетки-мишени разобщены, т.е. возникает необходимость транспортировки сигнальных биорегуляторов. Препараты арахидоновой кислоты в настоящее время получают из тканей млекопитающих, морских организмов и ряда

микробиологических источников [3].

У высших покрытосеменных растений арахидоновая кислота отсутствует, хотя  $C_{20}$ -полиеновая кислота обнаружена у более эволюционно древних хвойных растений и папоротников [4]. Предполагается, что у цветковых растений защитные функции аналогичные арахидоновой кислоты, реализуются при участии  $C_{18}$ -полиеновых кислот, представленных в основном фитостаноидными оксипинами [5, 6]. Однако для защиты растений от патогенов и биорегуляции в сельскохозяйственном производстве такие биопрепараты не используются.

При разработке экологически безопасных, эффективных индивидуальных и «смесевых» биопрепаратов природного происхождения для повышения устойчивости и продуктивности основных сельскохозяйственных культур необходимо учитывать и погодные условия. Условия неблагоприятной вегетации с нарастающей стрессовой нагрузкой на растения становится типичным для большинства аграрных регионов при разнонаправленном усилении негативных эффектов глобальных климатических изменений.

Извлечение липидов из семян льна проводилось двумя способами: прессованием (холодным отжимом) и экстракцией органическими растворителями [7]. Семена льна масличного сорта *ВНИИМК 620* подсушивали при  $60^{\circ}C$  в течение 12 часов и измельчали до муки. Экстракцию суммарных липидов проводили при  $+4^{\circ}C$  с 5-кратным объемом органического растворителя.

Экстракт сушили  $Na_2SO_4$ , фильтровали и растворитель отгоняли на роторном испарителе. Выход липидных компонентов 35%, агрегатное состояние льняного масла – светло-желтая жидкость. Полученные липиды хорошо растворяются в гексане и хлороформе, а воде и этаноле формируют эмульсию.

Идентификацию оксипиновых компонентов в липидных экстрактах семян льна проводили с использованием инфракрасной *ИК*-спектроскопии и

*ЯМР* – спектроскопии. Для оценки биологической активности полученных фракций оксипиринов, семена ячменя перед посевом обрабатывали путем опрыскивания рабочими растворами биопрепаратов. Для выращивания растений использовали рулонный метод в соответствии с ГОСТ 12036-85. Измеряли следующие параметры растений: всхожесть семян и энергию прорастания семян (в соответствии с ГОСТ 12038-84).

Экстракт масел растительного происхождения представляет собой смесь эфиров глицерина и высших жирных кислот и сопутствующих им веществ, извлекаемых из семян различными способами. Растительные масла в основном (на 95-97%) состоят из триацилглицеридов, а оставшаяся часть приходится на воски и фосфолипиды, а также свободные жирные кислоты, токоферолы, витамины и другие вещества, придающие маслам из различных источников окраску, вкус и запах. Это фракция содержит физиологически активные вещества, удаляемые при промышленном производстве растительных масел.

В основе процесса экстракции лежит способность липидов растворяться в органических растворителях: авторы испытали бензин (петролейный эфир), гексан и ацетон. Обычно в производстве используют бензин с низкой температурой кипения (63-75°C), содержащий значительные количества ароматических углеводородов. К недостаткам метода относится вероятность попадания нежелательных химических соединений (ароматические углеводороды) в конечный продукт. Предварительные эксперименты показали, что оптимальным способом экстракции липидной фракции из семян льна оказался гексан и холодное прессование (отжим); при экстракции ацетоном получался обводненная вытяжка, петролейный эфир загрязнял липиды.

Для последующего удаления растворителя из экстракта и сохранения биологически активных компонентов необходимо достигнуть быстрого и полного испарения экстрагента при возможно более низких температурах. Технологически этим требованиям удовлетворяет гексан: его температура

кипения равна 69<sup>0</sup>С, а при дистилляции в роторном испарителе удаление начинается при 30<sup>0</sup>С. Кроме того гексан по экологическим нормам относится к малотоксичным веществам.

На рис. 1 представлены результаты ИК–спектроскопии липидных компонентов холодного отжима из семян льна. Как видно, сигналы полосы поглощения карбонильных групп ( $C=O$ ) характеризующие сложноэфирную связь, находятся в области 1745 см<sup>-1</sup>; интервал валентных колебаний двойных связей находится в районе 1653 см<sup>-1</sup>. Это свидетельствует о том, что липидные экстракты из семян льна, полученные методом холодного отжима более многокомпонентны.

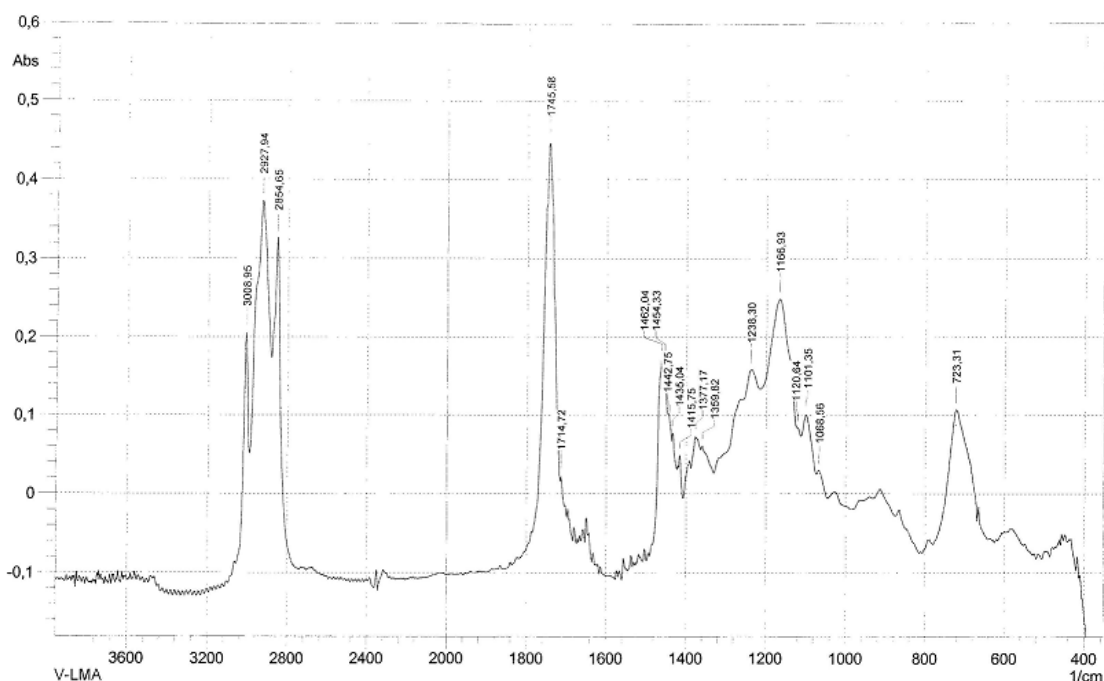


Рис. 1. ИК-спектр липидов семян льна холодного отжима

Биохимические реакции оксигенирования компонентов липидов – полиеновых жирных кислот с 18, 20 атомами углерода приводят к многочисленным соединениям с физиологической активностью, которые функционируют *in vivo* в качестве наносенсорных систем. На супрамолекулярном уровне оксилипиновые биорегуляторы участвуют в реализации защитных механизмов растений и поэтому могут использоваться в биотехнологическом повышении устойчивости к стрессам. При

механическом повреждении, а также при «атаке» насекомыми-вредителями и патогенными микроорганизмами в растениях индуцируется липоксигеназная сигнальная система [8].

Как известно, что ряд продуктов липидного обмена у растений выполняют функции гормонов, участвующих в реализации программ роста, морфогенеза, устойчивости к неблагоприятным факторам среды, в том числе и к микробным фитопатогенам. Предполагается, что окисленные метаболиты полиненасыщенных жирных кислот растений – *фитопростаноидные оксилипины* (в частности жасмоновая кислота) участвуют в защитных реакциях сельскохозяйственных культур при поражении насекомыми, микроорганизмами. Ключевой частью взаимоотношений фитопатогена с растительной клеткой на супрамолекулярном уровне является «запуск» биосинтеза *элиситоров* – фитопростаноидных оксилипинов: интермедиатов линоленовой кислоты, например, жасмоновой кислоты (рис.2):

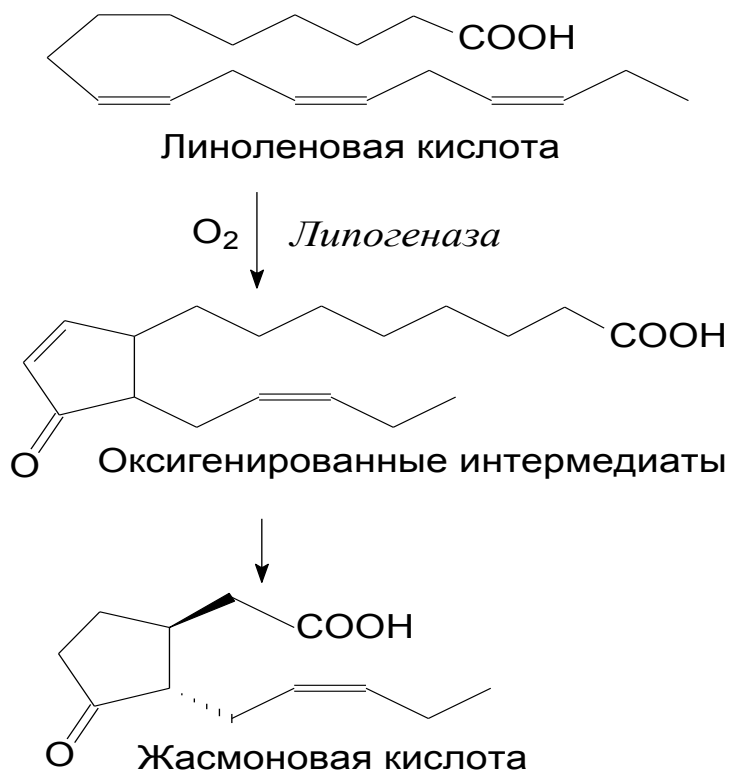


Рис. 2. Оксилипиновые биорегуляторы – стимуляторы защитных механизмов растений



Ключевой частью взаимоотношений ряда фитопатогенов с растительной клеткой на супрамолекулярном уровне является «запуск» биосинтеза *элиситоров* – *фитопростаноидных оксипинов*: интермедиатов линоленовой кислоты [9]. Окисленные метаболиты полиненасыщенных жирных кислот растений – *фитопростаноидные оксипины* участвуют в защитных реакциях на «прессинг» животных, насекомых, патогенов и стрессовых воздействий.

Сорбционное взаимодействие элиситора с рецептором на плазматической мембране приводит к активации фосфолипазы  $A_2$ , которая катализирует «выделение» из фосфолипидов биомембран ненасыщенных жирных кислот. Освободившиеся линолевая и линоленовая кислоты являются субстратами для фермента *липоксигеназы*. Промежуточные и конечные продукты липоксигеназного метаболизма  $C_{18:3(2)}$  кислот обладают бактерицидными, фунгицидными свойствами. Так, летучие продукты (гексенали и ноненали) токсичны для микроорганизмов и грибов; фитодиеновая, жасмоновая кислоты и метилжасмонат через активирование протеинкиназ повышают уровень экспрессии защитных генов. Это позволяет считать весьма перспективными дальнейшие исследования метаболического каскада триацилглицеринов и роли его отдельных метаболитов в общей системе регуляции роста и развития растений, их непосредственного влияния на внутриклеточные процессы, а также активность ключевых ферментов метаболизма.

При сравнении эффективности концентраций (разбавление  $1:10^4$ ,  $1:10^5$ ,  $1:10^6$ ,  $1:10^7$ ) биопрепарата [10] фитопростаноидов в составе масел семян льна, для обоих способов выделения, оптимальная концентрация оказалась одинаковой. Однако при холодном отжиме льняного масла энергия прорастания семян была выше относительно контроля на 6%, а при экстракции льняного масла гексаном эти величины оказались на одном уровне (табл. 1):

Таблица 1. Влияние биопрепаративных форм фитопростаноидов

из семян масличного льна на ростовые показатели ярового ячменя

*Биопрепарат №1 из семян льна (холодный отжим)*

Параметры Концентрации	Средняя длина побега, мм		Средняя длина корней, мм	
	48 часов	72 часов	48 часов	72 часов
Контроль	7,4	20,6	14,6	29,6
№1-1	8,5	21,6	15,9	28,9
№1-2	9,3	23,8	19,1	34,4
№1-3	8,9	23,4	18,7	28,7
№1-4	8,1	28,6	15,2	31,4

*Биопрепарат №2 из семян льна (гексановая экстракция)*

Параметры Концентрации	Средняя длина побега, мм		Средняя длина корней, мм	
	48 часов	72 часов	48 часов	72 часов
Контроль	5,4	13,8	9,9	33,6
№2-1	4,3	16,4	10,3	28,7
№2-2	4,1	15,0	8,7	28,9
№2-3	5,3	18,8	12,1	30,5
№2-4	4,6	16,6	9,0	30,2

Гексановая экстракция проявляет иммуностимулирующий эффект к болезням при более высоких концентрациях препаративной формы. Это означает, что многокомпонентность *елиситоров*, активность которых превалирует при холодном отжиме. Наилучшие варианты оксипириновых биопрепаратов из семян льна, выделенных методом холодного отжима, ускоряли рост корневой системы проростков ячменя; в варианте с гексановой экстракцией такой положительный эффект не проявился.

В результате проведенных работ можно сделать следующие выводы: установлено, что метод холодного отжима масла из семян льна по сравнению

с традиционным экстракционным методом является более эффективным для сохранения биологической активности; наиболее технологичным экстрагентом для получения фитостероидных биопрепаратов из семян льна является гексан.

Определено, что предпосевная обработка семян модельной культуры ярового ячменя биопрепаратами фитостероидных оксипинов из семян масличного льна существенно ускоряет рост корневой системы. Намечен эффективный подход сохранения нативных фитостероидов из семян масличного льна при добавлении природных антиоксидантов растений.

Растительные организмы используют линоленовую (и др. полиеновые) кислоты для сорбционного метаболизма мембраносвязанными ферментами в оксипроизводные: биорегуляторы жасмонатного типа и  $C_{18}$ -фитостераны. Достаточно высокая биоактивность, низкая себестоимость и экологическая безопасность оксипинов из семян льна позволяют отнести их к перспективным иммуномодуляторам защитных реакций аграрных культур.

#### **Список литературы:**

1. Попова Л.М. Химические средства защиты растений. – СПб.: СПбГТУРП, 2009. - 96 с.
2. Озерцовская О.Л., Ильинская Л.И., Васюкова Н.И. Механизмы индуцирования элиситорами устойчивости растений к болезням // Физиология растений. – 1994. – Т.41. – №4. – С.626-633.
3. Давлетбаев И.М., Петухова Н.И., Зорин В.В. Скрининг грибов – продуцентов арахидоновой кислоты // Тез. докл. Всерос. конф. «Биотехнология в ФЦП «Интеграция». – СПб: Изд-во СПбГТИ, 1999. - С.144.
4. Алаудинова Е.В., Миронов П.В. Липиды меристем лесобразующих пород центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации.  
1. Характеристика состава жирных кислот фосфолипидов зимующих

- меристем *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. // Химия растительного сырья. – 2009. – №2. – С.65-70.
5. Капустин М.А., Гавриленко Н.В., Курченко В.П. и др. Влияние обработки семян тритикале сорта «Микола» синтетическими простагландинами на биохимические процессы в проростках // Труды Белорус. госуниверситета. – 2011. – Т.6. Ч.1. – С.231-247.
  6. Durand T., Bultel-Ponce V., Guy A. et al. Isoprostanes and phytoprostanes: bioactive lipids. // Biochimie. – 2011. – V.93. – N.1. – P.52-60.
  7. Khalikov R.M. Bioactive lipid extracts triacylglycerols from the seeds of flax // Proc. Intern. Conf. “Chemistry and technology of vegetative extracts”. – Kutaisi: ATSU, 2011. – P.42-45.
  8. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. - 294 с.
  9. Егоров В.А., Латыпова З.Б., Халиков Р.М. Ростстимулирующее влияние фитопростаноидных оксипинов на метаболизм растений // Сб. материалов Всерос. конф. «Инновации в химии: достижения и перспективы». – Казань: КНИТУ, 2011. - С. 24-25.
  10. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – Москва.: Изд. Центр «Академия», 2008. – 208 с.