

Динамика содержания фенольных соединений при хранении клубней картофеля, обработанных биопрепаратами

Кипрушкина Е.И., Колодязная В.С.

kvs_holod@mail.ru

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет ИТМО

Институт холода и биотехнологий

*Приведены результаты исследований по влиянию обработки клубней картофеля, инфицированных грибом *P. infestans* и обработанных культуральной жидкостью бактерий-антагонистов рода *Bacillus* на образование фенольных соединений и динамику их содержания при холодильном хранении. Рассчитаны константы скорости реакции псевдопервого порядка образования хлорогеновой, кофейной кислот и флавоноидов. Показано, что бактерии *B. species* шт. 083, *B. subtilis* шт. ч.13 индуцируют синтез данных кислот.*

Ключевые слова: бактерии-антагонисты, картофель, фенольные соединения, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, хранение, температура, флавоноиды

В настоящее время рассматриваются различные защитные механизмы растительной клетки в ответ на инфицирование фитопатогенами на стадиях вегетации растений и хранения картофеля, плодов и овощей [1,2]. Основными из них является синтез в ответ на инфекцию фенольных соединений и продуктов их окисления, а также фитоалексинов, отсутствующих в интактных тканях и образующихся при воздействии неблагоприятных факторов, в том числе поражении возбудителями инфекционных заболеваний [3]. Образование фитоалексинов в растительной ткани вызывают различные грибы, как патогенные, так и не патогенные, бактерии и некоторые вирусы [4]. Накоплению фитоалексинов, как правило, предшествует клеточная дезорганизация в местах инфицирования, характерное для реакции сверхчувствительности [5,6]. Эффективность защитного механизма образующихся соединений различных классов зависит от их структуры и свойств, которые определяются только генотипом растения, а природа индуктора влияет на скорость и количество образовавшихся фитоалексинов. Чаще всего фитоалексины имеют терпеноидную природу, а также относятся к фенольным соединениям. Несмотря на то, что продуцирование фитоалексинов является генетическим признаком, оно в значительной мере зависит от факторов внешней среды и физиологического состояния вегетативных и генеративных органов растений, а также вида, рода и штамма микроорганизмов.

В институте холода и биотехнологий совместно с ВНИИ с/х микробиологии проводятся исследования по получению и применению биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов различных видов, родов и штаммов при выращивании и хранении сельхозпродукции.

Цель работы – исследовать влияние обработки клубней биопрепаратами на основе бактерий на динамику содержания фенольных соединений в процессе инфицирования и холодильного хранения.

Объектами исследования выбраны клубни картофеля сорта Невский, выращенные по общепринятой технологии на Павловской опытной станции ВИРа им. Н.И. Вавилова по общепринятой технологии.

Объектами микробиологических исследований выбраны культуральные жидкости (кж), содержащие бактерии-антагонисты и их метаболиты:

- *B. species* шт. 083 (Кж1);
- *B. subtilis* шт. ч.13 (Кж2); 076 (Кж3).

Титр бактерий в культуральных жидкостях составлял 10^8 - 10^9 кл/мл.

Биопрепараты получены во ВНИИ с/х микробиологии.

Клубни картофеля предварительно инфицировали основным возбудителем фитофтороза грибом *P. infestans*. Суспензий этого гриба (титр $1 \cdot 10^8$ кл/мл.) опрыскивали стерильные клубни, затем после инкубации при температуре 25°C в течение 48ч. Эти клубни также опрыскивали культурными жидкостями. Контрольные образцы клубней (неинфицированные *P. infestans*) и не обработанные Кж (К1), а также инфицированные *P. infestans*, но не обработанные Кж (К2), а также образцы инфицированные *P. infestans* и обработанные культуральными жидкостями (варианты 1-3) хранили при температуре $(18 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ и $(3 \pm 1)^{\circ}\text{C}$; Кж1(В1); Кж2(В2) и Кж3(В3).

Содержание хлорогеновой и кофейной кислот, монокарбоновых кислот и флавоноидов определяли по методикам, изложенным в работе [7]. Эксперименты проводили в трехкратной повторности, данные обрабатывали методами математической статистики с нахождением доверительного интервала при вероятности 0,95 с использованием компьютерных программ.

В процессе постановки эксперимента и последующих анализов экспериментальных данных установлено, что применение продуктов метаболизма бактерий-антагонистов исследуемых штаммов ускоряет процесс синтеза фенольных соединений (табл.1).

Из табл.1 следует, что в ответ на инфекцию в клубнях увеличивается количество монокарбоновых кислот, особенно кофейной как в клубнях инфицированных без обработки, так и обработанных культуральной жидкостью.

В последних синтез фенольных соединений протекает значительно быстрее и количество хлорогеновой кислоты увеличивается в 6,0 (В1), 1,9 (В2), 1,6 раз (В3), кофейной кислоты – в 11,7 (В1), в 8,0 (В2) и 5,9 раз (В3). Количество флавоноидов незначительно увеличивается в клубнях, обработанных по В1 и уменьшается – при обработке клубней по В2 и В3.

Таблица 1

Содержание фенольных соединений в инфицированных и обработанных культуральной жидкостью клубнях картофеля

Вид обработки	Содержание фенольных соединений, мг/100г		
	Хлорогеновая кислота	Кофейная кислота	Флавоноиды
$(t=18\pm 1)^{\circ}\text{C}$			
K1	15,2±0,4	2,4±0,3	18,4±1,2
K2	18,3±0,9	12,5±0,9	24,5±1,4
B1	91,3±6,4	28,2±1,4	22,3±1,3
B2	29,2±1,5	19,3±0,7	19,8±0,7
B3	24,8±1,4	14,3±0,8	20,8±0,8
$(t=3\pm 1)^{\circ}\text{C}$			
K1	15,2±0,4	2,4±0,3	18,4±1,2
K2	16,3±0,8	8,9±0,6	20,7±1,3
B1	76,4±5,6	24,2±1,1	18,7±1,2
B2	21,7±1,4	14,7±0,6	12,3±0,4
B3	19,3±1,2	10,7±0,4	8,6±0,3

Известно, что хлорогеновая и кофейная кислоты являются основными фенольными соединениями клубней картофеля. Очевидно, что увеличение количества фенольных соединений в ответ на инфекцию и обработку клубней Кж связано с повышением активности ферментов, катализирующих синтез хлорогеновой и кофейной кислот. Одной из важнейших функций фенольных соединений является участие в окислительно-восстановительных реакциях. Наличие защитной системы «фенольные соединения и фенолоксидазы» позволяет клеткам окислять ряд соединений, в том числе моно- и димерные фенольные соединения с рядовым расположением оксигрупп с образованием соединений, обладающим более сильным антагонистическим действием, чем фенольные соединения, содержащиеся в интактных тканях.

В табл.2 приведены константы скорости реакции псевдопервого порядка образования фенольных соединений в клубнях картофеля, инфицированных и обработанных Кж исследуемых штаммов бактерий-антагонистов рода *Bacillus*.

Таблица 2

Константа скорости образования фенольных соединений в инфицированных клубнях картофеля

Вид обработки	Фенольные соединения	Константа скорости накопления К	
		$(3\pm 1)^{\circ}\text{C}$	$(18\pm 1)^{\circ}\text{C}$
K2	Хлорогеновая	0,001	0,0088

	кислота		
	Кофейная кислота	0,026	0,078
	Флавоноиды	0,0024	0,014
В1	Хлорогеновая кислота	0,032	0,085
	Кофейная кислота	0,047	0,117
	Флавоноиды	0,0003	0,0091
В2	Хлорогеновая кислота	0,007	0,031
	Кофейная кислота	0,036	0,099
	Флавоноиды	-0,0082	0,0035
В3	Хлорогеновая кислота	0,0048	0,023
	Кофейная кислота	0,030	0,085
	Флавоноиды	-0,0125	0,0058

Как следует из табл.2 скорость реакций синтеза фенольных соединений, и особенно хлорогеновой и кофейной кислот существенно зависят не только от температуры, но и от вида и штамма бактерий рода *Bacillus*. Так, установлено, что максимальные значения К характерны для клубней, обработанных Кж1(В1), минимальные – Кж3(В3). В тоже время обработка клубней Кж1 и Кж2 не оказывает существенного влияния на образование флавоноидов, а обработка Кж2 и Кж3 замедляет синтез этих соединений. Очевидно, что под действием метаболитов, выделяемых бактериями –антагонистами указанных штаммов подавляется активность ферментов, принимающих участие в синтезе димерных фенольных соединений.

Поскольку фенольные соединения выполняют защитные функции в растительной клетке важное значение имеет изучение динамики содержания их при холодильном хранении картофеля. В табл.3 приведены данные, характеризующие изменение количества хлорогеновой кислоты в процессе хранения клубней, обработанных Кж, в течение 8 мес. Как следует из табл.3 наибольшее количество этой кислоты обнаружено в естественной перидерме, включающей меристематические ткани во время физиологического и вынужденного состояния покоя (4-6 мес).

Таблица 3

Динамика содержания хлорогеновой кислоты в естественной перидерме клубней при хранении ($t=3\pm 1$)⁰С, мг/100г

Вид обработки	Продолжительность хранения, мес				
	0	2	4	6	8
Контроль	15,2±0,4	44,6±2,7	48,0±4,6	40,2±2,3	5,6±0,4
Кж1	15,2±0,4	49,8±2,9	54,3±3,8	36,8±1,7	32,0±2,4
Кж2	15,2±0,4	52,4±3,1	58,4±4,6	50,0±4,1	30,4±2,1

КжЗ	15,2±0,4	15,2±1,4	27,0±1,8	40,2±2,3	21,4±2,3
-----	----------	----------	----------	----------	----------

По мере дальнейшего хранения и постепенного выхода из состояния вынужденного покоя количество хлорогеновой кислоты снижается, достигая минимальных значений через 8 мес хранения.

Таким образом, результаты по исследованию качественного и количественного состава фенольных соединений в естественной перидерме клубней картофеля, обработанных Кж бактериями-антагонистами, в процессе хранения показали, что обработка клубней Кж исследуемых штаммов бактерий-антагонистов несколько изменяет естественную динамику накопления фенольных соединений, свойственную необработанным клубням, способствует активации их биосинтеза, вероятно, за счет наличия индукторов защитных реакций среди метаболитов антагонистов или способности метаболитов ингибировать ферменты, катализирующие превращение фенолкарбоновых кислот. Показано, что бактерии *B. species* шт. 083, *B. subtilis* шт. ч.13 индуцируют синтез хлорогеновой и кофейной кислот.

Список литературы

1. Yuvamoto P.D., Said S. Germination, duplication cycle and septum formation are altered by caffeine, caffeic acid and cinnamic acid in *Aspergillus nidulans* //Микробиология. – 2007. – Т.76, №6. – С.830-833.
2. Кипрушкина Е.И., Колодязная В.С., Чеботарь В.К. Экологически безопасный биологический метод сохранения сельскохозяйственной продукции//Вестник защиты растений, 2003, №3. – С.17 – 24.
3. Степуро М.В., Щербаков В.Г., Лобанов В.Г. Влияние различных факторов на повышение хлорогеновой и кофейной кислот из семян подсолнечника// Известия вузов. Пищевая технология. – 2006. - №1. – С.49-51.
4. Кипрушкина Е.И., Петров В.Б., Чеботарь В.К. Защитно-стимулирующие свойства биопрепарата при вегетации и хранении картофеля//Доклады РАСХН, №3, 2005. – С.21-24.
5. Чеботарь В.К. и др. Разработка технологии получения микробных биопрепаратов на основе эндофитных бактерий для повышения продуктивности растений и улучшения плодородия почвы: Тезисы докладов МНПК «Инновационные биотехнологии в странах ЕВРАЗЭС».-СПб.: Биоиндустрия, 2013. – С.42-44.
6. Кипрушкина Е.И. Кинетика процесса раневой репарации клубней картофеля, обработанного биологическими средствами защиты//Вестник МАХ, 2007, №4.- С.38-44.
7. Лобанов В.Г., Щербаков В.Г., Прудникова Т.Н. и др. Лабораторный практикум по биохимии и пищевой химии: Учебн. пособие. – Краснодар, 2001. – 102 с.

Dynamics of phenolic compounds content during storage of potatoes treated with biological preparations

E.I. Kiprushkina, V.S. Kolodyznaya

kvs_holod@mail.ru

National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics

Institute of Refrigeration and Biotechnologies

*The paper covers studies results of the formation of phenolic compounds and the dynamics of their content during the cold storage of potato tubers infected by *P. infestans* and treated with suspension of antagonistic bacteria of the genus *Bacillus*. The pseudo-first order synthesis reaction rate constants of chlorogenic, caffeic acid and flavonoids are determined. It is shown that the bacteria *B. species st. 083*, *B. subtilis st. ch.13* induce the synthesis of these acids.*

Keywords: antagonistic bacteria, potatoes, phenolic compounds, chlorogenic acid , caffeic acid, long-term storage.