

## ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ЛИПАЗ СЕМЯН ПОДСОЛНЕЧНИКА *IN SITU*

Ю. А. Дьяченко, А. Д. Цикуниб

ФГБОУ ВПО «Адыгейский государственный университет»

Поступила в редакцию 15 июля 2015 г.

**Аннотация.** Изучено влияние ионов  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  на активность липаз семян подсолнечника *in situ*. Показаны особенности динамики ингибирования кислой и щелочной липаз под действием изучаемых металлов. Установлено, что ионы  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  при непосредственном контакте в модельных условиях существенно ингибируют липазный комплекс семян подсолнечника. Наибольший ингибирующий эффект на все формы липаз оказали ионы ртути. Ионы меди проявили выраженное ингибирующее действие на щелочную липазу. Проведено ранжирование металлов по интенсивности ингибирующего действия на разные формы липаз.

**Ключевые слова:** кислая липаза, щелочная липаза, ионы ртути, ионы меди, ионы свинца, семена подсолнечника.

**Abstract.** Is investigated the effect of ion  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  on the activity of lipase of sunflower seeds *in situ*. The features of the dynamics of inhibition of acid and alkaline lipases studied under the influence of metals. Is established that the ions  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  by direct contact in the model conditions significantly inhibit the lipase complex of sunflower seeds. The highest inhibitory effect on all forms of mercury ions lipases exerted mercury ions. Copper ions showed a pronounced inhibitory effect on the alkaline lipase. A ranking of metals intensity inhibitory effect on various forms lipases.

**Keywords:** acidic lipase, alkaline lipase, mercury ions, copper ions, lead ions, sunflower seeds.

Среди токсичных веществ, загрязняющих окружающую среду, тяжелые металлы занимают особое место, поскольку в отличие от неустойчивых и быстро трансформирующихся загрязняющих агентов, соединения тяжелых металлов в течение длительного времени сохраняют свое токсическое действие [1]. Повреждающее действие избыточных концентраций тяжелых металлов на растение может проявиться в нарушении поступления и распределения других минеральных веществ, нарушении транспорта ассимилянтов, изменении водного баланса, а также ингибировании активности ферментов [2].

Важным направлением экологического мо-

ниторинга является поиск ферментных маркеров загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами. Наряду с прочно вошедшими в практику ферментативного анализа протеазами, амилазами, дегидрогеназами, пероксидазами [3, 4, 5], широкое применение находят ферменты липолитического действия [6, 7]. В частности, в последнее время, возрос интерес к одному из важнейших гидролитических ферментов – липазе. Необходимо отметить, что степень поглощения тяжелых металлов из загрязненных почв у различных растений неодинакова, например, масличные культуры поглощают больше макро- и микроэлементов за счет более мощной корневой системы, по сравнению с колосовыми зерновыми, поэтому особенно актуальным является изучение именно маслич-

ных культур в качестве эколого-химического индикатора в мониторинге поступления тяжелых металлов [8].

Целью работы явилось установление динамики изменения активности липаз семян подсолнечника *in situ* в ответ на модельное загрязнение солями тяжелых металлов.

Теоретико-методологической основой исследования выступили следующие положения:

- регламентируемым показателем безопасности для семян подсолнечника является содержание таких тяжелых металлов, как ртуть, свинец и медь.

- ионы тяжелых металлов, в первую очередь -  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  и  $Cu^{2+}$ , относятся к высокотоксичным металлам, эффект токсического действия которых основан на образовании комплекса токсиканта с SH-группами белковых молекул, и сопровождающийся их повреждением и нарушением функций, что инициирует развитие токсического процесса [9].

- липаза семян подсолнечника относится к SH-содержащим белкам, причем SH-группа содержится в активном центре фермента [10].

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для исследований была выбрана заводская смесь семян подсолнечника урожая 2014 года с исходным низким содержанием изучаемых тяжелых металлов (не более 0.25 ПДК). Фоновое содержание тяжелых металлов определяли атомно-абсорбционным методом на приборе «Квант-Z. эта», Россия [11]. Измельченные ядра семян подсолнечника, контаминировали солями ртути, свинца и меди на уровне 0.25 ПДК, 1.0 ПДК, 2.0 ПДК и 4.0 ПДК. Согласно ТР ТС 015/2011 [12] ПДК свинца в семенах подсолнечника составляет 1.0 мг/кг, мышьяка – 0.3 мг/кг, ртути – 0.05 мг/кг, меди – 10 мг/кг (в указанных НД медь не нормируется, поэтому при выборе концентрации для контаминации ориентировались на ранее существовавшие требования СанПиН 2.3.2.560-96) [13]. Контаминацию проводили аликвотами водных растворов хлоридов указанных металлов, создавая условия непосредственного контакта металла с ферментом. Хлорид был выбран в качестве противоиона, как практически не оказывающий влияния на липазную активность [6] в условиях эксперимента. В исходных образцах семян подсолнечника и полученных модельных образцах проводили определение активности липазы титриметрическим методом по Ермакову [14]. Ис-

следование проводилось на двух видах буферных растворов (щелочной фосфатный буфер с pH-8 и кислотный ацетатный буфер с pH-4.7) со временем инкубирования 2 часа. К исходным (не контаминированным) и опытным пробам добавляли по 1 мл подсолнечного масла, тщательно перемешивали и приливали по 5 мл буферного раствора, после чего еще раз хорошо перемешивали смесь. Далее растертую массу переносили в конические колбы вместимостью 250 мл, добавляли по 2 капли толуола, закрывали пробкой и ставили в шейкер-инкубатор при температуре 30° С на 2 часа, после чего наливали 50 мл спирто-эфирной смеси и титровали 0.2 М спиртовым раствором КОН в присутствии фенолфталеина. Контрольную пробу, учитывающую фоновое содержание жирных кислот в семенах подсолнечника, готовили как предыдущие, но титровали без инкубирования в термостате.

Активность липазы вычисляли по формуле:

$$x = \frac{(a-b) \times k \times 10}{n}$$

где  $x$  – активность липазы, см<sup>3</sup> 0,1 М раствора КОН на 10 г семян за 2 часа;  $a$  – количество 0.2 М раствора КОН, израсходованное на титрование опытной пробы, см<sup>3</sup>;  $b$  – количество 0.2 М раствора КОН, израсходованное на титрование контрольной пробы, см<sup>3</sup>;  $k$  – поправочный коэффициент к 0.1 М раствору КОН ( $k=2$ );  $n$  – масса навески семян, г; 10 – пересчет активности липазы на 10 г семян.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования показали, что под действием солей исследуемых металлов наблюдается достоверное снижение активности как кислой, так и щелочной липаз, но с разной степенью интенсивности. Наибольший эффект ингибирования липазы проявляют ионы ртути (табл. 1).

При концентрации ионов ртути на уровне 0.25 ПДК наблюдается снижение активности кислой липазы на 42.4%, щелочной – на 45.8%, а на уровне 1.0 ПДК происходит практически полное ингибирование активности фермента. Механизм действия этого типичного представителя тиоловых ядов на липазу заключается в угнетении активности ферментной системы в результате блокирования SH-групп белковой молекулы.

Ионы  $Pb^{2+}$  также прочно связываются с лигандами, имеющими сульфгидрильные группы [10], но не столь прочно, как ионы  $Hg^{2+}$ . Так ингибирующая способность  $Pb^{2+}$  оказалась ниже, по сравнению с таковой для  $Hg^{2+}$  и составила для кислой

и щелочной липаз 39.2% и 36.8% соответственно при концентрации 0.25 ПДК (табл. 2).

При концентрации  $Pb^{2+}$  на уровне 1.0 ПДК произошло резкое снижение активности обеих липаз в 1.7 раза, а при 4.0 ПДК степень ингибирования для кислой липазы составила – 72.6%, для щелочной – 82.5%.

Схожую динамику снижения ферментативной активности проявили также ионы  $Cu^{2+}$ , но с более выраженным эффектом действия на щелочную липазу. Так, при 0.25 ПДК активность щелочной липазы снизилась на 40.35%, что почти в 2 раза выше по сравнению с ингибированием кислой липазы (табл. 3).

Далее, при увеличении концентрации ионов металла, различие в ингибирующем действии на разные формы липазы оказалось минимальным, в то же время, увеличилась интенсивность ингибирования, которая на уровне 4.0 ПДК составила 82.4% и 93.0% соответственно. Имеются данные, что  $Cu(II)$ , восстанавливаясь до состояния  $Cu(I)$  окисляет незащищенную сульфгидрильную группу до дисульфидной, снижая активность фермента [15].

На рисунке 1 представлены графики изменения активности щелочной липазы под действием ионов  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  и  $Cu^{2+}$ , а также линии тренда, где уравнения линейной регрессии имеют вид:  $y = -1.6027x + 7.0239$  с величиной достоверности ап-

Таблица 1

*Изменение активности липаз под действием ионов ртути*

Пробы	Уровень загрязненности ионами ртути	Активность липазы, мл КОН на 10 г семян за 2 ч.	
		Щелочной	Кислой
Исходная проба	0.001 ПДК	9.5±0.71	17.0±1.0
Опытные пробы	0.25 ПДК	5.2±0.54*	9.8±0.6*
	1.0 ПДК	0.7±0.6*	1.1±0.01*
	2.0 ПДК	0.04±0.01*	0.03±0.02*
	4.0 ПДК	0.02±0.1*	0.02±0.01*

Примечание: \* $p \leq 0.01$  – достоверность различий с контролем

Таблица 2

*Изменение активности липаз под действием ионов свинца*

Пробы	Уровень загрязненности ионами свинца	Щелочной	Кислой
Исходная проба	Не более 0.02 ПДК	9.5±0.71	17.0±1.0
Опытные пробы	0.25 ПДК	6.0±1.0*	10.3±0.6*
	1.0 ПДК	3.7±0.59*	6.3±0.59*
	2.0 ПДК	2.7±0.6*	5.3±0.58*
	4.0 ПДК	1.7±0.6*	4.7±0.59*

Примечание: \* $p \leq 0.01$  – достоверность различий с контролем

Таблица 3

*Изменение активности липаз под действием ионов меди*

Пробы	Уровень загрязненности ионами меди	Активность липазы, мл КОН на 10 г семян за 2 ч.	
		Щелочной	Кислой
Исходная проба	Не более 0.01 ПДК	9.5±0.71	17.0±1.0
Опытные пробы	0.25 ПДК	5.7±0.59**	13.3±1.5*
	1.0 ПДК	1.3±0.6**	6.7±0.58**
	2.0 ПДК	1.0±0.01**	5.0±1.0**
	4.0 ПДК	0.7±0.6**	3.0±1.0**

Примечание: \* $p \leq 0.05$  \*\*  $p \leq 0.01$  – достоверность различий с контролем

Таблица 4

Ранжирование тяжелых металлов эффекта ингибирующего действия на активность липаз подсолнечника.

Фракции липазы	0.25 ПДК	1.0 ПДК	2.0 ПДК	4.0 ПДК
Щелочная	Hg <sup>2+</sup> >	Hg <sup>2+</sup> >	Hg <sup>2+</sup> >	Hg <sup>2+</sup> >
Кислая	Hg <sup>2+</sup> >	Hg <sup>2+</sup> >	Hg <sup>2+</sup> >	Hg <sup>2+</sup> >

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по результатам исследований установлено, что ионов Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup> при непосредственном контакте в модельных условиях существенно ингибируют липазный комплекс семян подсолнечника, с наибольшим ингибирующим эффектом на все формы липаз ионов Hg<sup>2+</sup>, и выраженным ингибирующим действием на щелочную липазу ионов Cu<sup>2+</sup>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ильин В.Б. Тяжелые металлы в системе почва-растение / В.Б. Ильин / Новосибирск: Наука. — 1991 — 150 с.
- Христофорова Н.К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения морских вод тяжелыми металлами / Н.К. Христофорова — ДВО АН СССР. — Л.: Наука. — 1989. — 192 с.
- Мугинова С.В. Ферментативное определение кадмия, цинка и свинца в растительных объектах. / С.В. Мугинова, И.А. Веселова, Л.М. Парова, Т.Н. Шеховцова // Журн. аналит. Химии — 2008. — Т. 63. №10. — С. 1103-1113.
- Muginova S.V. Hydrophilic ionic liquids as novel reaction media for the determination of guaiacol using horseradish and soybean peroxidases / S.V. Muginova, A.Z. Galimova, A.E. Poliakov, T.N. Shekhovtsova // Mendel. Comm.. — V. 21. №2 — 2011. — P. 97-98
- Домаш В.И. Протеолитические ферменты и ингибиторы трипсина высших растений в условиях стресса / В.И. Домаш, Т.П. Шарпио, С.А. Забрейко, Т.Ф. Сосновская // Биоорганическая химия — 2008. — Т. 34, № 3. — С.353-357.
- Зубарева И.М. Изучение липазной активности *Blakeslea Trispora* продуцента бета-каротина / И.М. Зубарева, Н.Б. Митина, Е.С. Кириченко // Вопросы химии и химической технологии — 2012. № 1. — С. 32-35.
- Сливкин А.И. Изучение условий совместной иммобилизации трипсина и липазы на хитозане / А.И. Сливкин, А.С. Беленова, Ю.В. Добрина, С.И. Провоторова // Вестник воронежского госу-

проксимации  $R^2 = 0.6925$  для свинца,  $y = -1.7938x + 6.2344$  с  $R^2 = 0.5698$  – для меди и  $y = -1.8064x + 5.5112$  с  $R^2 = 0.5172$  для ртути.

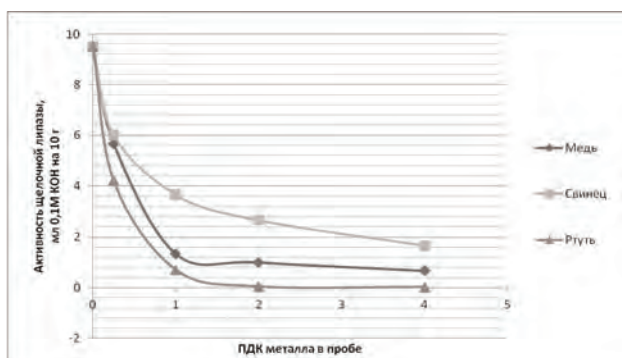


Рис. 1. Динамика активности щелочной липазы под действием разных концентраций тяжелых металлов.

Резкое снижение активности фермента подтверждается относительно невысокими значениями величины достоверности аппроксимации (от 0.52 до 0.69).

Для кислой липазы (рис. 2) графики снижения активности фермента описываются уравнениями вида:  $y = -2.376x + 12.179$  – для свинца,  $y = -3.1517x + 13.57$ – для меди,  $y = -3.4917x + 10.653$ - для ртути. Выведенные для них линии тренда показали большую величину достоверности аппроксимации для ионов свинца  $R^2 = 0.7473$ , по сравнению с щелочной липазой, для свинца и меди -  $R^2 = 0.5685$ ,  $R^2 = 0.5592$  соответственно, что аналогично действию щелочной липазы.

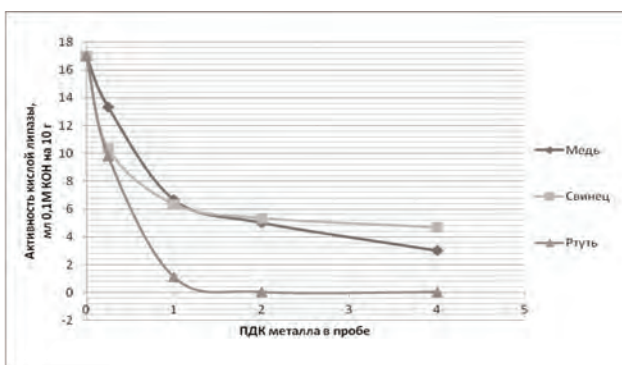


Рис. 2. Динамика активности кислой липазы под действием разных концентраций тяжелых металлов.

Сравнительный анализ полученных данных позволил ранжировать металлы по эффекту ингибирующего действия изученных металлов на активность липаз семян подсолнечника (табл. 4).

Дьяченко Ю. А., Цикуниб А. Д.

дарственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2015. — № 1. — С.120-124.

8. Серов С.Н. Содержание микроэлементов и тяжелых металлов в семенах масличных культур / С.Н. Серов, Д.Ф. Асхадуллин // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана — 2010. №1. — С.251-254.

9. Юртов Е.В. Химическая токсикология. Текст лекций / Е.В. Юртов, Ю.А. Лейкин // М.:РХТУ им. Д. И. Менделеева — 1987 — 40 с.

10. Косицин А.В. Взаимодействие металлов с ферментами / А.В Косицин // В кн. Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов. Под ред. Алексеевой-Поповой Н.В. — Ленинград. —1991. — С.15-22.

11. ГОСТ 30178-96 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определе-

ния токсичных элементов.- Введен в действие с 01.01.98—Москва: Стандартинформ, 2010.— 10с.

12. ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна». Технический регламент таможенного союза.- Введен в действие от 9 декабря 2011 г. № 874 — 38 с.

13. Санитарные правила и нормы: СанПиН 2.3.2.560-96 Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Утверждены Постановлением Госкомсанэпиднадзора РФ от 24 октября 1996 г. № 27

14. Ермаков А.И. (Ред) Методы биохимического исследования растений / Ермаков А.И. - Изд. 3-е, перераб. и доп. — Л.: Агропромиздат. Ленингр. отделение, 1987. — 430 с.

15. Щербаков, В.Г (Ред.) Биохимия растительного сырья: Учебник для вузов / В.Г. Щербаков. — М. : Колос. — 1999. — 375 с.

*Адыгейский государственный университет  
Дьяченко Ю. А., аспирантка кафедры ботаники факультета естествознания, эксперт-биохимик лаборатории нутрициологии и экологии НИИ комплексных проблем АГУ*

*Тел.89284679097*

*E-mail: jesi-001@mail.ru*

*Цикуниб А. Д., доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедры химии факультета естествознания АГУ, директор НИИ комплексных проблем АГУ,*

*Тел. 8928461725*

*E-mail: cikunib58@mail.ru.*

*Adyghe State University*

*Dyachenko Y. A., Post-graduate student of the Department of Botany the Faculty of Natural Science, an expert biochemist lab Nutrition and Ecology of SRI for complex problems ASU*

*Ph.: 89284679097*

*E-mail: jesi-001@mail.ru*

*Tsikunib A. D., Sc.D., Professor, Head of the Department of Chemistry the Faculty of Natural Science of ASU, director of ASU's Institute for Complex Problems*

*Ph. 8928461725*

*E-mail: cikunib58@mail.ru.*