

УДК 582.751.42:581.48

А. Н. Левчук, аспирант**Е. Н. Войтович**, к.б.н., доцент**В. А. Лях**, д.б.н.

Запорожский национальный университет, кафедра садово-паркового хозяйства и генетики растений,

ул. Жуковского, 66, Запорожье, 69063, Украина, e-mail: genetika@znu.edu.ua

**ЛЕКТИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ КИСЛОЙ ЛИПАЗЫ СЕМЯН ЛЬНА
МАСЛИЧНОГО (*LINUM HUMILE* MILL.)**

Исследовали взаимосвязь липолитической и лектиновой активности семян трех генотипов льна масличного (*Linum humile* Mill.). Установлено, что препараты липазы, выделенные при оптимальном для каждого генотипа значении рН, обладают наиболее высоким уровнем лектиновой и липолитической активности. Лектиновая активность в зависимости от концентрации проявляется по-разному. При высоких концентрациях белка в выделенном препарате ($0,16-1,68$ (мг/мл)⁻¹) лектиновая активность проявляется в виде гемолиза трипсинизированных эритроцитов кролика, а при низких ($1,35 \times 10^3 - 1,85 \times 10^9$ (мкг/мл)⁻¹) – в виде их агглютинации.

Ключевые слова: *Linum humile*, лектины, кислая липаза, липолитическая, гемоглютинирующая, гемолитическая активность.

Основную роль в иммобилизации запасных веществ играют гидролитические ферменты. Так, липаза, присутствующая в семенах масличных культур, способна расщеплять жиры на жирные кислоты и глицерин [4]. У масличных культур обычно присутствуют две липазы: кислая, которая активируется при набухании семян в кислой среде (рН 4,0–5,5), и нейтральная (рН 6,0–8,0), функционирующая на стадии прорастания семени [4].

В последнее время все больше внимания уделяется таким биологически активным веществам как лектины (лектиноподобные белки или агглютинины). Благодаря своей способности распознавать и избирательно связывать углеводы клеточных поверхностей они находят очень широкое применение в препаративной биологии и медицине [2, 9]. Установлено, что роль лектинов не ограничивается распознаванием только углеводов, они способны узнавать белки, липиды, витамины, фитогормоны и т.д. [8, 13]. Среди лектинов найдены так называемые бифункциональные лектины [10, 15], обладающие, кроме углеводсвязывающей, ещё и ферментативной активностью. Известны также лектины, способные регулировать работу ферментов [11]. Так, по мнению некоторых авторов, одной из основных функций лектинов в микроорганизмах, растениях и животных является кофункциональное с литическими ферментами [17]. Лектины распознают углеводсодержащие рецепторы, прикрепляются к ним и индуцируют ферментативную активность.

Гилбоа-Гарбер [17] была выдвинута гипотеза, согласно которой носителем одновременно ферментативной и лектиновой активности может быть или один бифункциональный лектин – белковая молекула, которая имеет как ферментативный, так и лектиновый домен, или две отдельные молекулы – фермент и лектин, которые образуют сложный лектин-ферментный комплекс. Аналогичная

гипотеза была приведена также другими авторами: относительно взаимосвязи лектиновой и определенных ферментативных активностей (α -, β -глюкозидазных и β -галактозидазной у микроорганизмов рода *Azospirillum* [1], протеолитической активности у *Bacillus polymyxa* [12]).

С другой стороны, известно, что некоторые гидролитические ферменты растений (например, амилаза) могут проявлять лектиновую активность [10, 15].

Кроме того, известно, что помимо гемагглютинирующей, некоторые лектино-подобные белки растений (группа рибосоминактивирующих лектинов) обладают и гемолитической активностью [20, 21]. Такие лектины были обнаружены в составе грибов родов *Laetiporus*, *Amanita*, *Mycena* [3, 18]. В пользу того, что фитолектины могут вызывать гемолиз эритроцитов свидетельствуют, в частности, результаты исследования механизмов гемолитической активности холерных вибрионов, в ходе которых было показано участие лектинового рецептора возбудителя в лизисе эритроцитов [6]. Кроме того, была обнаружена гемолитическая активность у лектиновых экстрактов ряда лекарственных растений [5].

При сравнении аминокислотного состава липазы *Euphorbia characias* и лектина (В-цепи рицина) [19] выявили гомологию на 42,5 % и на основе этого выдвинули гипотезу о том, что лектиновая и липолитическая активность семян растений семейства молочайных связаны между собой. В дальнейшем было установлено, что именно В-цепь рицина обладает липолитической активностью.

Целью работы было выделение и определение активности кислой липазы семян льна, а также определение лектиновой активности полученного ферментного препарата.

Материалы и методы исследования

Определяли липолитическую и лектиновую активность семян льна масличного (*Linum humile* Mill.) сортообразцов Золотистый, К-7276 и К-7354, существенно различающихся по уровню масличности. Так, масличность сорта Золотистый составляет 49 %, К-7276 – 42,0 %, а К-7354 – 38,7 %.

Семена (0,5 г) измельчали и гомогенизировали в течение 20 мин с добавлением 10 мл 0,1 М цитрат-фосфатного буферного раствора с разными значениями pH (4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2 и 5,4) для извлечения кислой липазы (КФ 3.1.1.3) [4]. Полученную суспензию центрифугировали при 10 000 г в течение 15 мин, отбирали верхний жировой слой и высаливали содержащиеся в экстракте белки (в том числе и липазу) с помощью 2 мл насыщенного раствора хлорида натрия с 0,05 % содержанием Тритона X-100. Полученный осадок отделяли центрифугированием (10 000 г в течение 15 мин) и разводили в 0,4 мл 0,9 % раствора хлорида натрия (экстракт кислой липазы). От Тритона X-100 избавлялись при помощи изоамилового спирта: к 0,4 мл полученного экстракта добавляли 1 мл изоамилового спирта, встряхивали и центрифугировали при 8 000 г в течение 5 мин – тритон X-100 переходил при этом в верхний изоамиловый слой, липаза оставалась в нижнем солевом слое, который считали препаратом липазы и использовали для определения липолитической активности, титра гемагглютинации и титра гемолиза. Активность липазы определяли титрометрическим методом [14]. Количество органических кислот до и после действия фермента устанавливали путём титрования инкубационной смеси 0,1 н раствором гидроксида натрия. Лектиновую (агглютинирующую и гемолитическую) активность определяли по реакции гемагглютинации

с 2 % суспензией трипсинизированных эритроцитов кролика [2, 9]. За критерий лектиновой и гемолитической активностей принимали минимальное количество белка, при котором наблюдается геагглютинация или гемолиз соответственно, причем активность выражали как обратную величину – коэффициент геагглютинирующей $(\text{мкг/мл})^{-1}$ и гемолитической активности $(\text{мл/мл})^{-1}$. Изменение формы эритроцитов при воздействии лектинов в процессе гемолиза регистрировали на микроскопических препаратах при помощи тринокулярного микроскопа XS-3330 и окулярной камеры МА88-500 при увеличении $\times 1\ 600$: на предметное стекло помещали 5 мкл суспензии эритроцитов и добавляли к ней равный объём экстракта кислой липазы (опыт) или 0,9 % раствора хлорида натрия (контроль). Общее содержание белка в экстракте определяли по методу Варбурга-Кристиана [16]. Исследования проводили при пятикратном повторе, результаты обрабатывали с помощью стандартных статистических методов [7].

Результаты исследования и обсуждение

Установлено, что кислая липаза различных генотипов льна масличного имеет разный оптимум рН. Максимальную активность липаза семян льна сортообразца Золотистый проявляет при рН 4,4; К-7276 – при рН 4,2; а К-7354 – при рН 4,0 (табл. 1).

Таблица 1

Липолитическая активность (мл 0,1 н гидроксида натрия) семян льна масличного в зависимости от рН экстрагента

№ п/п	рН экстрагента	Название сортообразца		
		Золотистый	К-7276	К-7354
1.	4,0	1,82 ± 0,330**	0,35 ± 0,031*	0,30 ± 0,030
2.	4,2	2,98 ± 0,675*	0,55 ± 0,075	0,10 ± 0,003**
3.	4,4	3,88 ± 0,860	0,26 ± 0,019*	0,08 ± 0,011**
4.	4,6	1,56 ± 0,245**	0,18 ± 0,029**	0,06 ± 0,006**
5.	4,8	0,98 ± 0,358**	0,16 ± 0,006**	0,05 ± 0,016**
6.	5,0	0,88 ± 0,235**	0,04 ± 0,004**	0,03 ± 0,007***
7.	5,2	0,19 ± 0,075***	0,01 ± 0,003**	0,01 ± 0,003***
8.	5,4	1,11 ± 0,223***	0,01 ± 0,002**	0,01 ± 0,004***

Примечание: *, **, *** – отличия от выделения при оптимальном значении рН достоверны при $P < 0,05$; 0,01 и 0,001 соответственно; значение липолитической активности при оптимальной кислотности для каждого генотипа выделено жирным курсивом.

При различных значениях рН липолитическая активность существенно колебалась. Так, у препарата липазы семян сортообразца Золотистый липолитическая активность варьировала от 0,19 до 3,88 единиц удельной активности (при оптимальных условиях). У сортообразцов К-7276 и К-7354 диапазон регистрируе-

мой липолитической активности составил 0,01–0,55 и 0,01–0,30 единиц активности соответственно (табл. 1).

Уровень липолитической активности семян зависит от сортообразца льна (табл. 1). Так, активность липазы у сортообразца Золотистый намного выше по сравнению с другими сортами и составляет около 4 единиц активности. Активность этого фермента у семян сортообразцов К-7276 и К-7354 значительно ниже и составляет около 0,5 и 0,3 единиц соответственно. В аналогичный последовательный ряд исследованные сортообразцы располагаются и по содержанию масла в семенах. Поэтому можно предположить наличие положительной корреляционной связи между этими признаками.

Кроме того, полученные нами препараты кислой липазы проявляли лектиновую (гемагглютинирующую) активность, уровень которой также зависел от условий выделения (табл. 2).

Таблица 2
Коэффициент лектиновой (гемагглютинирующей) активности (мкг / мл)⁻¹ семян льна масличного в зависимости от рН экстрагента

№ п/п	рН экстрагента	Название сортообразца		
		Золотистый	К-7276	К-7354
1.	4,0	7,56 ± 0,488***	(2,35 ± 0,205) × 10 ^{3**}	(1,85 ± 0,181) × 10 ⁹
2.	4,2	21,53 ± 0,522***	(1,88 ± 0,248) × 10 ⁵	(3,92 ± 0,253) × 10 ^{8**}
3.	4,4	1351,36 ± 66,627	(8,64 ± 0,566) × 10 ^{2**}	(3,74 ± 0,859) × 10 ^{8***}
4.	4,6	1,48 ± 0,157***	(1,37 ± 0,071) × 10 ^{2**}	(1,72 ± 0,407) × 10 ^{5***}
5.	4,8	0,97 ± 0,131***	12,05 ± 0,871**	(4,15 ± 0,748) × 10 ^{5***}
6.	5,0	0,44 ± 0,048***	0,94 ± 0,036**	(4,19 ± 1,539) × 10 ^{2***}
7.	5,2	0,11 ± 0,011***	0,32 ± 0,014**	49,42 ± 10,067***
8.	5,4	0,48 ± 0,053***	0,03 ± 0,001**	0,18 ± 0,027***

Примечание: То же, что и в таблице 1.

Наибольший коэффициент гемагглютинирующей активности был выявлен у сорта К-7354, а наименьший – у Золотистый. При этом колебания в зависимости от кислотности среды были существенными, отличались в сотни раз и зависели от источника фермента. Так, препарат липазы семян сортообразца К-7276 имел самый высокий коэффициент гемагглютинирующей активности (1,88 × 10⁵ (мкг/мл)⁻¹) при рН 4,2, которая при незначительном уменьшении кислотности среды (при рН 4,0) снижалась примерно в 80 раз, а при рН 4,4 – в 200 раз.

Зависимость между значением коэффициента гемагглютинирующей активности и масличностью исследованных сортообразцов – обратная: образцы с высоким содержанием масла имели низкую лектиновую активность и наоборот. Так, у высокомасличного сортообразца Золотистый коэффициент лектиновой активности оказался наименьшим и при оптимальной кислотности среды составил 1351,36 (мкг/мл)⁻¹, у среднемасличного сортообразца К-7276 лектиновая

активность оказалась выше примерно в 140 раз и составила $1,88 \times 10^5$ (мкг/мл)⁻¹, а у низкомасличного К-7354 – в 14×10^5 раз.

В результате проведённых исследований было выявлено, что «препараты кислой липазы» льна масличного обладают одновременно липолитической и лектиновой активностью.

Высокие показатели лектиновой активности и большие различия между лектиновой активностью у одного генотипа (сортообразца) в разных условиях выделения и между различными генотипами в одинаковых условиях объяснялось использованием для определения активности лектинов трипсинизированных эритроцитов кролика, которые являются на несколько порядков более чувствительными к лектинам льна по сравнению с эритроцитами человека (наши экспериментальные данные).

Прослеживается зависимость липолитической и лектиновой активности выделенных препаратов в зависимости от pH среды. Так, у препаратов, выделенных из семян сорта Золотистого, максимальная и лектиновая, и липолитическая активность наблюдается при pH 4,4; у препаратов, полученных из семян К-7276, – при pH 4,2; а у препаратов, полученных из генотипа К-7354 – при pH 4,0. Вообще, pH-зависимое изменение обеих активностей носит генотипо-специфичный характер. Это подтверждается достаточно высокими коэффициентами корреляции: для сорта Золотистый +0,74, для сортообразцов К-7276 и К-7354 – +0,77 и +0,96 соответственно.

Было обнаружено, что помимо гемагглютинирующей активности выделенный препарат липазы обладает ещё и гемолитической. Так, при оптимальных условиях экстракции для высокомасличного сорта Золотистый коэффициент гемолитической активности был равен $0,16 \pm 0,008$ (мг/мл)⁻¹, для среднемасличного сортообразца К-7276 – $0,35 \pm 0,008$ (мг/мл)⁻¹, а для низкомасличного К-7354 – $1,68 \pm 0,165$ (мг/мл)⁻¹. Различия между гемолитической активностью у различных сортообразцов оказались достоверно значимыми. Динамика развития гемолиза при действии лектинов следующая: через 10–30 минут после начала реакции лектины в большой концентрации (порядка мг / мл) вызывают изменение формы эритроцитов, что, в конечном счете, и приводит через 1,5–2 часа к их гемолизу (рис. 1).

Выявлено, что изменение формы эритроцитов при воздействии лектинов зависит от генотипа льна. Так, в контроле (0,9 % раствор хлорида натрия) эритроциты имеют округлую правильную форму без деформаций (рис. 1а), лектины сорта Золотистый вызывают приобретение эритроцитами амёбовидной формы (рис. 1б), сортообразца К-7276 – приводят к удлинению эритроцитов и скручиванию в трубочку (рис. 1в), а сортообразца К-7354 – к сморщиванию эритроцитов (рис. 1г).

Обнаружено, что препарат с высоким значением лектиновой активности (титр от 1:1 до 1:16 для сортообразцов К-7276 та К-7354 и титр от 1:1 до 1:64 для сорта Золотистый) обладает гемолитическим эффектом.

Обнаружение в выделенном препарате гемолитической активности позволяет предположить присутствие в нём лектиноподобных белков группы рибосоминактивирующих лектинов.

Динамика развития реакции гемолиза оказалась иной у препаратов, выделенных из разных генотипов льна. Аналогичную специфичность показал и общий уровень гемагглютинирующей и гемолитической активностей выделенных препаратов (табл. 1 и 2). Так, наибольшие значения обеих характеристик отмечены для

«препарата кислой липазы», выделенного из семян сорта К-7354, а наименьшие – из семян сорта Золотистый.

Таким образом, полученные препараты активной кислой липазы семян льна обнаружили лектиновую активность и показали зависимость ее уровня от генотипа и условий выделения. Установленная корреляционная связь (коэффициент корреляции составляет от +0,74 до +0,96 в зависимости от генотипа) между этими признаками позволяет предположить существование лектин-ферментного функционального комплекса. Целесообразность такого объединения базируется на одновременной оптимизации процессов презентации и утилизации запасных веществ на начальном этапе онтогенеза *Linum humile* Mill.

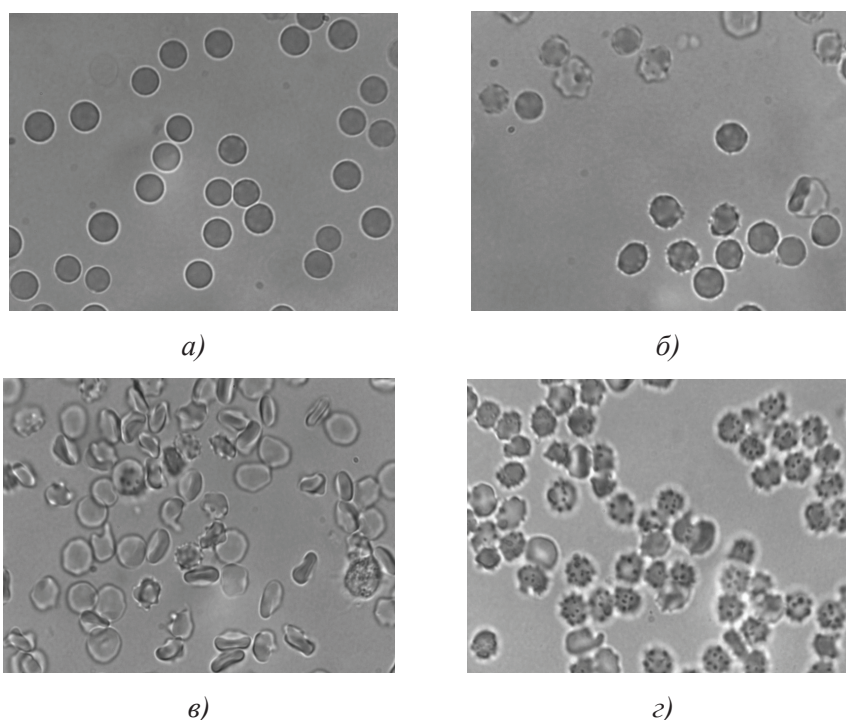


Рис. 1. Изменение формы эритроцитов при воздействии лектинов семян льна масличного различных генотипов: а) контроль; б) сорт Золотистый ($0,16 \text{ мг/мл}^{-1}$); в) сортообразцов К-7276 ($0,35 \text{ мг/мл}^{-1}$); з) сортообразцов К-7354 ($1,68 \text{ мг/мл}^{-1}$).

Выводы

У препарата кислой липазы, выделенной из семян льна масличного, помимо липолитической обнаружена также лектиновая активность.

Выявленная положительная корреляция между лектиновой и липолитической активностями предполагает существование лектин-ферментного функционального комплекса, обеспечивающего эффективную мобилизацию запасного материала семян *Linum humile* Mill.

Лектиновая активность семян льна по-разному проявляется в зависимости от концентрации белка в препарате: при высоких концентрациях – в виде гемолиза, а при низких – в виде агглютинации трипсинизированных эритроцитов кролика.

Список используемой литературы

1. Аленькина С. А. Изучение взаимосвязи лектиновой, α -, β -глюкозидазных и β -галактозидазной активности азоспирилл / С. А. Аленькина, В. Е. Никитина, М. В. Борисова-Головко // Микробиология. — 2001. — Т. 70, № 5. — С. 647–650.
2. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела / В. О. Антонюк. — Л.: Основа, 2005. — 554 с.
3. Антонюк В. О. Вуглеводна специфічність лектину, одержаного з плодкових тіл міцени чистої (*Miscena pura* Kunt.), та його використання у гістохімічних дослідженнях / В. О. Антонюк, А. М. Ященко, Р. В. Антонюк, Н. О. Амбарова // Biopolymers and Cells. — 2009. — Vol. 25(6). — P. 466–475.
4. Броберхоф Х. Липолитические ферменты / Х. Броберхоф, Р. Дженсен. — М.: Мир, 1978. — 396 с.
5. Канделинская О. Л. Лектины лекарственных растений дикорастущей флоры Беларуси: перспективы использования / О. Л. Канделинская, Е. Р. Грищенко, Л. В. Обуховская и др. // Вестник Фонда фундаментальных исследований. — 2011. — № 2. — С. 169–184.
6. Колякина А. В. Лектиновые рецепторы холерных вибрионов : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук.: спец. 03.00.07 «Микробиология» / А. В. Колякина. — Ставрополь, 2009. — 18 с.
7. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М.: Высшая школа, 1990. — 351 с.
8. Линевиц Л. И. Лектины и углеводов– белковое узнавание на разных уровнях организации живого / Л. И. Линевиц // Успехи биологической химии. — 1979. — Т. 20. — С. 71–89.
9. Луцук М. Д. Лектины / М. Д. Луцук., В. М. Панасюк, А. Д. Луцук— Львов: Вища школа, 1981. — 156 с.
10. Ляшок А. К. Амілолітична і лектинова активність у проростаючих зернівках озимої пшениці за дії високотемпературного стресу / А. К. Ляшок, І. П. Григорюк, Т. П. Нижнік, П. О. Феоктісов // Физиология и биохимия культурных растений. — 2003. — Т. 35, № 2. — С. 172–177.
11. Марков Е. Ю. Лектины растений: предполагаемые функции / Е. Ю. Марков, Э. Е. Хавкин // Физиология растений. — 1983. — Т. 30, № 5. — С. 852–867.
12. Мельникова У. Ю. Протеолитическая активность лектинов азотфиксирующих бактерий *Vacillus polytuxa* / У. Ю. Мельникова, Л. В. Карпунина, Н. В. Остахина, В. В. Игнатов // Микробиология. — 2001. — Т. 70, № 2. — С. 259–262.
13. Мирошниченко О. С. Лектины и распознавание белковых лигандов / О. С. Мирошниченко // Український біохімічний журнал. — 1999. — Т. 71, № 5. — С. 5–9.
14. Практикум по биохимии / под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьёвой. — М.: МГУ, 1989. — С. 81–83.
15. Феоктісов П. О. Сполученість в динаміці амілолітичної та лектинової активності в процесі проростання зернівок озимої пшениці / П. О. Феоктісов, І. П. Григорюк, А. К. Ляшок // Физиология и биохимия культурных растений. — 2002. — Т. 34, № 3. — С. 260–263.
16. Dawson R. Data for Biochemical Research / R. Dawson, D. Elliott, U. Elliott, K. Jones. — 2nd edn. Oxford: Clarendon Press, 1986. — 464 p.
17. Gilboa–Garber N. — Purification of the galactose– binding hemagglutinin of *Pseudomonas aeruginosa* by affinity column chromatography using sepharose / N. Gilboa– Garber, L. Mizrahy, N. Garber // FEBS Lett. — 1972. — Vol. 28. — P. 93–95.

18. Khan F. Fungal lectins: current molecular and biochemical perspectives / F Khan, M. I. Khan // International J. of Biological Chemistry. — 2011. — Vol. 5, № 1. — P. 1–20.
19. Moulin A. Lipases of the Euphorbiaceae family: purification of a lipase from *Euphorbia characias* and structure-function relationships with the B chain of ricin / A. Moulin, M. Teissere, Ch. Bernard, G. Pierony // Biochemistry. — 1994. — Vol. 91. — P. 11328–11332.
20. Patocka J., Streda L. Plant toxic proteins and their significance for warfare and medicine / J. Patocka, L. Streda // J. of Applied Biomedicine. — 2003. — Vol. 1. — P. 141–147.
21. Sehgal P. Purification, characterization and toxicity profile of ricin isoforms from castor beans / P. Sehgal, M. Khan, O. Kumar, R. Vijayaraghavan // Food Chem. Toxicol. — 2010. — Vol. 48, N. 11. — P. 3171–3176.

Статья поступила в редакцию 24.09.2012

Г. М. Левчук, О. М. Войтович, В. О. Лях

Запорізький національний університет, кафедра садово-паркового господарства та генетики рослин,
вул. Жуковського, 66, Запоріжжя, 69600, Україна

ЛЕКТИНОВА АКТИВНІСТЬ КИСЛОЇ ЛІПАЗИ НАСІННЯ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО (*LINUM HUMILE* MILL.)

Резюме

Досліджували взаємозв'язок ліполітичної та лектинової активності насіння трьох генотипів льону олійного (*Linum humile* Mill.). Встановлено, що препарати ліпази, які були виділені при оптимальному для кожного генотипу значенні рН, мають найвищий рівень лектинової та ліполітичної активності. Лектинова активність залежно від концентрації проявляється по-різному. За високих концентрацій білку у виділеному препараті (0,16–1,68 (мг/мл)⁻¹) лектинова активність проявляється у вигляді гемолізу трипсинизованих еритроцитів кроля, а при низьких (1,35 × 10³ – 1,85 × 10⁹ (мкг/мл)⁻¹) – у вигляді їх аглютинації.

Ключові слова: *Linum humile* Mill., лектини, кисла ліпаза, ліполітична, гемаглютинуюча, гемолітична активність.

A. N. Levchuk, H. N. Voitovych, V. A. Lyakh

Zaporizhzhya National University, Department of Land-usage Industry and Plant Genetics,
66, Zhukovskogo Str., Zaporizhzhya, 69600, Ukraine

THE LECTIN ACTIVITY OF SOUR LIPASE IN SEEDS OF OIL FLAX (*LINUM HUMILE* MILL.)

Summary

The interconnection between lipolytic and lectin activity in the seeds of three oil flax (*Linum humile* Mill.) genotypes was investigated. It was found that lipase preparation, extracted at optimal for every genotype pH, showed the highest level of lectin and lipolytic activity. Depending on the concentration of protein the lectin activity appears in different way. At high concentrations of protein in the isolated preparation (0,16 – 1,68 (mg/ml)⁻¹) lectin activity causes haemolysis of trypsinized rabbit erythrocytes, but at low (1,35 × 10³ – 1,85 × 10⁹ (mkg/ml)⁻¹) concentration causes their agglutination.

Key words: *Linum humile* Mill., lectins, drug lipase, lipolytic activity, hemagglutinin activity, haemolytic activity.