

АНТИРОСТОВОЕ И АНТИМЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОРОСТКИ ПШЕНИЦЫ И РИСА

¹Смашевский Н.Д., ¹Ионова Л.П.

¹*Астраханский государственный университет, Астрахань, e-mail: smashevsky@yandex.ru*

В статье изложены результаты изучения действия сорбиновой кислоты (СБК) на энергию прорастания и всхожесть семян, рост органов, синтез хлорофилла и дыхание проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и риса (*Oriza sativum* L.). Характер действия СБК зависит от её концентрации и биологических особенностей исследуемых культур. В концентрации 100 и 200 мг/л СБК оказывает дифференцированно ингибирующее действие на энергию прорастания и всхожесть семян, рост органов проростков, синтез в листьях хлорофилла и дыхание, при этом рис был более устойчив. В концентрации 50 мг/л проявляет некоторую стимуляцию образования хлорофилла и интенсивности дыхания обеих культур, тогда как концентрация 400 мг/л вызывает полное подавление у них всех изученных процессов. Повышенная резистентность проростков риса к действию СБК обусловлена высокой устойчивостью к кислородной гипоксии, синтезом высокой активности энергосберегающих ферментов, особенно активной оксидазы гликолевой кислоты. Результаты исследований и анализ литературных данных привели авторов к мысли, что в связи с весьма широким применением СБК в пищевой промышленности в качестве консерванта (консервант E200) при определенных обстоятельствах она может поступать в организм человека в количествах, превышающих допустимую норму, и наносить вред здоровью. Показаны факты негативного действия СБК на организм человека и животных. Авторы предлагают учитывать это при консервации часто используемых пищевых продуктов.

Ключевые слова: сорбиновая кислота, торможение, стимуляция, энергия прорастания семян, всхожесть семян, проростки, рост, синтез хлорофилла, дыхание, консервант E200.

GROWTH INHIBITORY AND ANTIMETABOLITIC ACTION OF SORBIC ACID ON THE SEEDLINGS OF WHEAT AND RICE

¹ Smashevsky N.D., ¹ Ionova L.P.

¹*Astrakhan State University, Astrakhan, e-mail: smashevsky@yandex.ru*

In the article the results of studying the action of sorbic acid (SBA) on germination energy and germination of seeds, growth of organs, the synthesis of chlorophyll and respiration of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L) and rice (*Oriza sativum* L.). The character of action SBA depend on its concentration and biological characteristics of the investigated cultures. At a concentration of 100 and 200 mg/l has differentiated the inhibitory effect on the germination energy and germination of seeds, growth of seedlings organs, the synthesis in the leaves of chlorophyll and respiration, while the rice was more stable. At a concentration of 50 mg/l SBA showing some stimulation of the formation of chlorophyll and the respiration rate of both cultures, while the concentration of 400 mg/l causes complete suppression they have all studied processes. The increased resistance of rice seedlings to the action of SBK due to the high resistance to oxygen hypoxia, the synthesis of high energy saving activity of enzymes, especially oxidase glycolic acid. Research results and literature data led the authors to believe that the very wide application of SBA in the food industry as a conservant (conservant E200) under certain circumstances it can enter the human organism in amounts exceeding the permitted limit and cause harm to health. Shows the facts for the negative effect of SBA on the human organism and animals. The authors propose to account this on in conserving of frequently used food products.

Keywords: Sorbic acid, inhibition, stimulation, energy of seed germination, germination of seeds, seedlings, growth, synthesis of chlorophyll, respiration, conservant E200.

Сорбиновая кислота (СБК) 2,4 гексадионовая кислота ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) является природным противомикробным веществом. Впервые СБК была получена в 1859 году из рябинового сока Миллером (Германия) и несколько месяцев спустя независимо от него Гуддингом (США). В 1950 году она была синтезирована и установлено её высокое бактериостатическое и фунгистатическое действие, после чего она в возрастающих

масштабах стала применяться как консервант пищевых продуктов. По основному характеру антиметаболического действия СБК связана с функциями КоА, катализирующего более 130 биохимических реакций, с которым она образует трудно метаболизируемый сорбил-КоА [11].

Поэтому по сравнению с другими антимикробными средствами СБК имеет весьма широкий спектр действия на микробные организмы. Это обусловлено её механизмом действия с охватом важных метаболических и ростовых процессов, с изменением структуры клеточных мембран, ингибированием транспортных систем и клеточных ферментов, потоком протонов в клетку и изменением рН внутренней среды [12]. Также установлено, что СБК конкурентно подавляет энолазу, предотвращая ферментацию глюкозы у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [9].

Важным моментом основы механизма антиметаболического действия СБК является блокирование сульфгидрильных ферментов. СБК вызывает ингибирование активности фермента фумаразы, которое снижается добавлением в среду цистеина. Известно, что фумараза из винных дрожжей *Pichia membranifaciens* содержит в активном центре имидазольную группу гистидина с SH-группой цистеина [4], и которая обнаружена как в митохондриях, так и в цитозоле клеток животных тканей. СБК тормозит также аспартазу и сукцинатдегидрогеназу, действие которой снижалось также добавлением тиола, что подтверждает механизм её действия против сульфгидрильных ферментов или кофакторов, которое обусловлено реакцией присоединения тиола с насыщением её двойных связей [10].

Все выше сказанное свидетельствует, что СБК является полифункциональным ингибитором с антиметаболическим действием.

Такой широкий спектр антиметаболического действия СБК, взаимодействующей с большим количеством важнейших ферментов, и особенно с КоА, вызывает значительный интерес к расширению исследований характера действия СБК и на растениях, как модели иной формы метаболизма клеток и растения в целом, на которых исследований крайне мало.

Целью наших исследований было изучение действия СБК на ключевые физиологические и метаболические процессы высших растений: энергию прорастания семян, их всхожесть, рост проростков, синтез хлорофилла и дыхание пшеницы и риса.

Материал и методы исследований

Изучали действие синтетической сорбиновой кислоты на проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и риса (*Oriza sativum* L.). Семена изучаемых культур стерилизовали 5%-ной перекисью водорода в течение 30 мин, раскладывали по 30 штук в чашках Коха на бумажную фильтровальную подложку и заливали 10 мл дистиллированной воды (контроль)

и в опытные варианты растворы сорбиновой кислоты с концентрацией 50; 100; 200 и 400 мг/л. Семена проращивали в термостате при температуре 27 °С. Энергию прорастания в % определяли на 3-и сутки по количеству проросших семян, всхожесть в % – на 7-е сутки подсчетом всех проросших и наклюнувшихся семян. Сразу после этого выставляли проростки на свет под лампы ДРЛ -250 и через 24 часа определяли содержание хлорофилла в зеленеющих листьях в спиртовой вытяжке колориметрическим методом [7] с помощью электроколориметра КВК-2МП, с красным светофильтром длиной волны 670 нм, и рассчитывали по калибровочной кривой в мг на 1 г сырого веса. Интенсивность дыхания определяли методом Варбурга по количеству поглощенного кислорода в мкл 7-дневными проростками и пересчитывали на 1 г растительной массы за 1 час [3]. Рост корня и надземной части в мм измеряли на 10-е сутки у 10 растений каждого варианта и повторности. Повторность всех вариантов и биохимических определений трёхкратная. Результаты всех вариантов обрабатывали статистически с вычислением средней арифметической и стандартной ошибки опыта [6].

Результаты и их обсуждение

СБК оказала подавляющее действие как на энергию прорастания, так и на всхожесть семян обеих культур, соответственно возрастающим концентрациям. Однако пороговая концентрация 100 мг/л действует на эти процессы у пшеницы и риса по-разному. Оказалось, что в этой концентрации подавляющее действие СБК на энергию прорастания и всхожесть семян риса значительно слабее. Если у пшеницы энергия прорастания подавлялась на 43%, а всхожесть на 43,4%, то у риса подавление составило всего 17,4% и 12% соответственно.

Но уже в концентрации 200 мг/л тормозящее действие СБК на обеих культурах на эти процессы сравнялось и было в пределах для пшеницы соответственно 51,5% и 50% и для риса 57,6% и 55,5%, тогда как 400 мг/л вызывали у них полное подавление (табл. 1).

Стоит обратить внимание на пониженную чувствительность прорастающих семян риса к действию пороговой концентрации СБК. Мы считаем, что это может быть связано с биологическими особенностями риса. Установлено, что прорастание семян риса происходит при значительно низкой потребности в содержании кислорода, чем семян пшеницы. Семена риса легко прорастают при строжайшем исключении кислорода из среды [2]. Можно предположить, что для активного действия СБК необходимы реакции, зависящие от присутствия кислорода.

Таблица 1

Влияние сорбиновой кислоты на энергию прорастания и всхожесть семян

пшеницы и риса

Сорбиновая кислота, мг/л	Пшеница				Рис			
	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	% торможения		Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	% торможения	
			Энергия прорастания	Всхожесть			Энергия прорастания	Всхожесть
0	58,4	60,0	0	0	97,0	98,0	0	0
100	29,6	34,0	43,0	43,4	80,2	81,2	17,4	12,0
200	28,3	30,0	51,5	50,0	60,5	63,4	57,6	55,5
400	0,9	0,0	98,5	100	0,6	98,6	99,6	99,4

Более эффективное ингибирующее действие СБК отмечено после прорастания и начала ростовых процессов корней и листьев проростков, сохраняя в определенной степени специфичное действие в отношении разных культур (табл. 2).

Таблица 2

Влияние сорбиновой кислоты на рост органов 10-дневных проростков пшеницы и риса

Сорбиновая кислота, мг/л	Рост органов проростков							
	Пшеница				Рис			
	Корень, мм	Торможение, %	Листья, мм	Торможение, %	Корень, мм	Торможение, %	Листья, мм	Торможение, %
0	91,3±2,3	0	86,6±4,1	0	72,4±3,3	0	47,5±2,1	0
100	39,5±1,2	56,7	84,4±3,5	2,5	38,6±1,4	46,7	43,8±2,7	7,9
200	23,4±0,8	74,4	53,8±2,0	37,9	15,7±0,8	78,3	45,6±2,2	4,0
400	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,0	100

Особенно активно проявляется тормозящее действие СБК на гетеротрофные корни практически одинаково как у пшеницы, так и риса, которое составило при концентрации СБК 100 и 200 мг/л соответственно у пшеницы 56,7% и 74,4% и у риса 46,7% и 78,3%. А вот листья обеих культур оказались более устойчивы к этим концентрациям. Рост листьев пшеницы снизился только в концентрации 200 мг/л на 37,9%, тогда как у риса в этих концентрациях тормозящее действие практически не наблюдалось. Однако концентрация СБК 400 мг/л оказалась токсичной для всех органов проростков пшеницы и риса, рост полностью отсутствовал, а проклюнувшиеся зачаточные корешки отмирали. Такой характер чувствительности прорастающих семян и роста органов проростков, особенно корней, можно объяснить особенностями прорастания семян. Известно, что первоначальное проклевывание прорастающих семян обусловлено увеличением сформированного зародыша не за счет новообразования в осевых органах, а за счет гидролитических процессов в эндосперме и возрастающего осмотического давления в клетках зародыша, которые

насыщаются водой с образованием и увеличением вакуолей, растягивающих эластичные клеточные стенки зародышевых корешков.

Дальнейший рост корня связан с активацией метаболических процессов и новообразованием клеток и клеточных структур с участием ферментов и конечно КоА. А так как СБК является антагонистом КоА – это обеспечивает её активное ингибирующее действие, которое позволяет сделать вывод, что антиметаболическое действие СБК проявляется в активно метаболизирующих клетках.

Специфический характер действия СБК как антагониста КоА четко проявился на процессах синтеза хлорофилла и дыхания проростков пшеницы и риса.

Известно, что КоА принимает непосредственное участие в синтезе хлорофилла, превращая низкомолекулярные соединения ацетата, гликокола или глутамата с образованием в биохимическом цикле предшественника хлорофилла аминолевулиновой кислоты, скорость образования которой лимитирует весь процесс синтеза хлорофилла [1]. В связи с этим наблюдается сходство характера действия СБК на образование хлорофилла при зеленении листьев пшеницы и риса в течение суток на свету с характером действия на ростовые процессы этих культур.

Влияние СБК на синтез хлорофилла по характеру действия был совершенно аналогичным как в листьях пшеницы, так и в листьях риса. В низкой концентрации порядка 50 мг/л наблюдалось заметное стимулирование образования хлорофилла в листьях пшеницы и риса на 25,0% и 20,6% соответственно, что можно объяснить ответной реакцией на биохимический стресс. Более высокие концентрации 100 и 200 мг/л уже вызвали заметное торможение синтеза хлорофилла обеими концентрациями в листьях пшеницы (12,5%), тогда как у риса торможение в этих концентрациях было незначительно, в пределах ошибки опыта (2% и 5%). А вот при максимальной концентрации порядка 400 мг/л синтез хлорофилла в листьях пшеницы и риса подавлялся полностью (табл. 3).

Таким образом, СБК как ингибитор КоА через образование трудно метаболизируемого сорбил-КоА исключает КоА из метаболических процессов, связанных с синтезом предшественника хлорофилла.

Таблица 3

Влияние сорбиновой кислоты на образование хлорофилла в зеленеющих листьях проростков пшеницы и риса

Сорбиновая кислота, мг/л	Содержание хлорофилла в мг на 1 г сырого веса листа			
	пшеница		рис	
	мг/г	% торможения	мг/г	% торможения
0	1,20±0,03	0	1,02±0,04	0
50	1,50±0,07	+ 25,0	1,23±0,05	+ 20,6
100	1,05±0,02	12,5	1,00 ±0,02	2.0

200	1,05±0,02	12,5	0,97±0,02	5,1
400	0	100	0	100

Это согласуется с влиянием СБК и на процесс дыхания, которое имеет совершенно одинаковый характер действия, что может указывать на сходство в этих процессах механизма действия СБК. Как известно, КоА участвует в первичных реакциях запуска окислительного процесса пировиноградной кислоты в аэробной фазе дыхания (цикл Кребса), а СБК образует с ним трудно метаболизируемый комплекс сорбил-КоА [11]. Логично возникает вопрос, как будет влиять СБК на процесс дыхания растений с различными биологическими свойствами пшеницы и риса, отличающихся устойчивостью к кислородной гипоксии. Рис обладает высокой устойчивостью к кислородному голоданию не только прорастающих семян, но и его проростков [13].

Действие СБК на интенсивность дыхания оказалось зависимым не только от её концентрации, но и от биологических особенностей тестируемых культур (табл. 4).

Таблица 4

Влияние сорбиновой кислоты на интенсивность дыхания проростков пшеницы и риса

Сорбиновая кислота, мг/л	Пшеница		Рис	
	поглощение O ₂ , мкл/г /час	% торможения	поглощение O ₂ , мкл/г /час	% торможения
0	26,7±2,0	0	12,8±1,7	0
50	27,9±1,9	+4,5	13,5±1,9	+ 5,4
100	14,3±1,1	46,4	12,8±1,1	0
200	2,4±0,8	91,0	4,3±1,3	33,6

Общим для обеих культур является то, что СБК в низкой концентрации действовала на поглощение кислорода при дыхании так же биполярно, как и в синтезе хлорофилла, слабо стимулируя процесс в низкой концентрации (50 мг/л), и подавляла при высоких (100-200 мг/л). Причем подавление поглощения кислорода проростками пшеницы было значительно выше по сравнению с рисом. Если у проростков пшеницы торможение при 100 и 200 мг/л составляло 46,% и 91,0% соответственно, то торможение у риса было отмечено только в концентрации 200 мг/л и составляло всего 33,6%. То есть чувствительность риса к антиметаболическому действию СБК значительно ниже, чем пшеницы. Вероятно, это связано с особенностями отношения риса к кислородному дыханию. Из данных таблицы 4 видим, что в контроле у пшеницы поглощение кислорода при дыхании значительно интенсивнее, чем у риса, и составило 26,7 мкл O₂ на грамм сырого веса/час, тогда как у риса

оно составило всего 12,8 мкл/г/час. Эта биологическая особенность может быть объяснением повышенной устойчивости риса к действию СБК.

Это согласуется и с литературными данными [13], в которых показано, что в условиях строгого исключения кислорода в клетках растений риса сохраняется интактная ультраструктура, что обеспечивает синтез белков и даже довольно активный рост надземной части проростков. У них наряду с активацией ферментов при кислородной недостаточности индуцируются события на генном уровне, приводящие к *de novo* синтезу ферментов, катализирующих реакции энергосбережения клетки. В этом, по-видимому, и заключается один из главных «секретов» биохимической адаптации растений риса, способных, в отличие от других видов, длительно обходиться без кислорода.

Кроме того, у риса оксидаза гликолевой кислоты обладает высокой активностью в листьях и стеблях и весьма слабой у корней, тогда как у сухопутных растений, в том числе и пшеницы, её активность слабая или отсутствует вообще. Считается, что оксидаза гликолевой кислоты специфична для риса [8]. Поэтому листья риса наиболее устойчивы к гипоксии и действию СБК.

Заключение

Таким образом, СБК в зависимости от концентрации оказывает антиростовое и антиметаболическое действие на высшие растения. В пределах 100 и 200 мг/л оказывает тормозящее действие на энергию прорастания и всхожесть семян, рост корней и листьев, синтез хлорофилла и дыхание проростков пшеницы и риса. Причем СБК действует дифференцированно, проявляя более высокую активность на процессы пшеницы, чем риса, а в концентрации 50 мг/л заметно стимулирует синтез хлорофилла и дыхания у обеих культур, тогда как в концентрации 400 мг/л проявляет токсичность и полностью подавляет все процессы обеих культур. Повышенная резистентность проростков риса к действию СБК обусловлена особенностями его биологических свойств, которые характеризуются высокой устойчивостью к кислородной гипоксии, синтезом *de novo* ферментов, катализирующих реакции энергосбережения клетки и высокой активностью оксидазы гликолевой кислоты.

Результаты наших исследований о воздействии СБК на высшие растения и литературные данные о широком спектре механизма её антибиотического действия привели к мысли связать это с тем, что СБК является широко используемым консервантом в пищевой промышленности (консервант E200). В предписаниях к её применению она характеризуется как безопасное органическое соединение при допустимой пороговой норме 25 мг/кг массы здорового человека [5]. Результаты наших экспериментов показали, что 400 мг/л СБК проявляют токсичность и полностью подавляют как ростовые, так и метаболические процессы у высших растений. Учитывая весьма широкое применение СБК

для консервирования продуктов питания: в производстве напитков, в кондитерском и пекарском деле, в составе мясных и колбасных изделий, сыров, икры, молочных продуктов и др., возникает опасение, что она при определенных обстоятельствах может поступать в организм человека в количествах, превышающих допустимую пороговую норму, и наносить вред здоровью. И факты вредного действия на животный организм, в том числе и человека, описаны в научной литературе.

Так, отмечены при употреблении СБК (E200) аллергические реакции у человека, кроме того, вред ее заключается в разрушении цианокобаламина (витамина В₁₂) в человеческом организме, что может провоцировать гибель нервных клеток и привести к различным неврологическим расстройствам [5]. Оказалось, что окислительный стресс, вызванный при кормлении мышей едой с высоким уровнем доз сорбиновой кислоты, индуцировал у них гепатому в печени, что было связано с образованием труднометаболизируемого сорбил-КоА и истощением в печени восстановленного глутатиона [14; 16]. Кормление мышей с добавлением 15% СБК к весу пищи индуцировало пероксисомные Н₂О₂, генерирующие ферменты, вызывающие повреждение печени [15]. Поэтому мы предлагаем учитывать это при использовании СБК в качестве консерванта пищевых продуктов, которые часто и в значительных количествах употребляются человеком, чтобы не превысить допустимый пороговый уровень и не нанести вред здоровью.

Список литературы

1. Аверина Н.Г., Яронская Е.Б. Биосинтез тетрапиролов в растениях. – Минск : Беларусь. Навука, 2012. – 430 с.: ил.
2. Вартапетян Б.Б. Растения и кислородный стресс // Вестник Российской академии наук. – 2013. - Т. 63, № 11. – С. 999-1009.
3. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Юковейникова Т.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. - Л. : Агропромиздат, 1987. – С. 41-45.
4. Керученко Е.А., Глидинин К.Л. Выделение и свойства фумаразы из дрожжей *Pichia membranefaciens* // Биохимия. – 1990. - 55 (2). – С. 326-328.
5. Консервант сорбиновая кислота E200 – вред, применение. - URL: <http://www.neboleem.net/sorbinovaja-kislota.php> (дата обращения: 17.06.2016).
6. Плохинский Н.А. Биометрия. – 2-е изд. – М. : Изд-во Московского университета, 1970. – 367 с.

7. Смашевский Н.Д. Практикум по физиологии растений : учебное пособие / Астраханский государственный университет. – Астрахань : Издательский дом «Астраханский университет», 2011. – 77 с
8. Физиология сельскохозяйственных растений. Т. 5. Физиология кукурузы и риса. – 1969. – С. 285.
9. Azukas J.J., Costilow R.N., Sadoff H.V. Inhibition of alcoholic fermentation by sorbic acid. // J. Bacteriol. – 1961. - 81. – С. 189-194.
10. George K. York, Reese H. Vaughn. Mechanisms in the inhibition of microorganisms by sorbic acid // Journal of bacteriology. – 1964. - Vol. 88, No. 2. – P. 411-417.
11. Salin J. Wakil and George Hübscher. Quantitative determination of coenzyme A by sorbyl-coenzyme A formation // J. Biol. Chem. – 1960. - Vol. 235, № 6. – P. 1554-1558.
12. Sofos J.N., Pierson M.D., Blocher J.C., Bosta E.F. Mode of action of sorbic acid on bacterial Sells and spores // Internatinal Journal of Food Microbiology. – 1986. - V. 3. Issue 1. – P. 1-17.
13. Sachs M.M., Jackson M.B., Davies D.D., Lambers H. Plant life under Oxigen deprivation // SPB Academic Publishing. - The Hague< The Netherlads< 1991. – P. 129-140.
14. Tomoko Nishimaki-Mogami, Akira Tanaka, Ken-Ichiro Minegishi and Atsushi Takahash. Effect of sorbic acid feeding on peroxisomes and sorboyl-CoA metabolizing enzymes in mouse liver. Selective induction of 2,4-dienoyl-coa hydratase // Biochemical Pharmacology. – 1991. - Vol. 42. No. 2. – P. 239-246.
15. Tsuchiya T and Yamaha T, The production of mutagens in the intestine of mice fed on a diet containing 15% sorbic acid (I) // J Toxicol Sci. – 1983. - 8. – P. 15-24.
16. Tsuchiya T. and Yamaha T. Depletion of the reduced glutathione level in the liver and production of the mutagens in the intestine in the mice inducing hepatoma by feeding on a high level dose of sorbic acid //Mutation Res. – 1984. - 130. – P. 267-272.