

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Биология. Химия. Том 11 (77). 2025. № 4. С. 267–272.

УДК 547.918:543.422:582.5/.9+577.151

DOI 10.29039/2413-1725-2025-11-4-267-272

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ЛИСТЬЕВ И ПЛОДОВ ВИДОВ РАСТЕНИЙ РОДА ПЛЮЩ (*HEDERA* L.)

Гришковец В. И.

*Институт биохимических технологий, экологии и фармации (структурное подразделение)
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Россия
E-mail: vladgri56@yandex.ru*

В статье рассмотрено выделение и характеристика ферментного препарата из листьев и плодов видов растений рода плющ (*Hedera* L.). Предложен простой способ выделения ферментного препарата, основанный на экстракции свежего растительного сырья водой с последующим осаждением белков (ферментов) ацетоном. Проведена оценка и показана высокая специфичность действия ферментного препарата в отношении ацилгликозидной связи в тритерпеновых гликозидах растений семейства Аралиевые.

Ключевые слова: Araliaceae, тритерпеновые гликозиды, ферментативные методы анализа.

ВВЕДЕНИЕ

Растительные ферменты представляют обширную и довольно хорошо изученную группу природных белковых соединений [1]. Они играют ключевую роль в биохимических процессах, ускоряя химические реакции, необходимые для роста, развития и обмена веществ растений и их устойчивости к различным поражениям и заболеваниям. Кроме того, ферменты принимают самое активное участие в трансформации природных соединений в растениях как в стадиях роста, так и гибели растений. Наиболее важные группы таких растительных ферментов это оксидоредуктазы, трансферазы и гидролазы.

При выделении природных соединений с целью установления их структуры, и в частности изучаемых нами тритерпеновых гликозидов, нельзя не учитывать присутствие и действие растительных ферментов. Настоящая статья посвящена исследованию гидролазного действия ферментного препарата из листьев и плодов плюща, в частности плюща крымского (*Hedera taurica* Carr.) на тритерпеновые гликозиды в процессе их выделения из тканей растения и изучению возможностей использования полученного препарата в структурных исследованиях тритерпеновых гликозидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение суммарного ферментного препарата гликозидаз из листьев или семян плюща проводили следующим образом: растительный материал тщательно диспергировали с 5–10 кратным весовым количеством воды в течение примерно 5 минут, полученную суспензию центрифугировали при 9000 об/мин, супернатант отделяли от осадка растительных тканей. К супернатанту добавляли 10-кратный объем ацетона и осаждали сумму белков (ферментов). Для дополнительной очистки суммарную осажденную белковую фракцию растворяли в минимальном (5–10 кратном) количестве воды и вновь переосаждали 10-кратным избытком ацетона. Осадок дополнительно обрабатывали 2–3 раза сухим ацетоном для удаления остатков воды и отфильтровывали на стеклянном фильтре.

Ферментативный гидролиз осуществляли путем растворения субстрата (бисдесмозидного тритерпенового гликозида) приблизительно в 100-кратном количестве воды, добавления 5–10 кратного весового количества фермента, тщательного перемешивания смеси и выдерживания при 40–50 °C в течение от нескольких часов до суток с ТСХ контролем. После завершения процесса добавляли 3–5 кратный объем метанола, нагревали до кипения и отделяли денатурированный фермент центрифугированием. Супернатант упаривали досуха или экстрагировали бутанолом и продукты ферментолиза анализировали с помощью ТСХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При выделении тритерпеновых гликозидов из различных растений семейства Аралиевые (Araliaceae Juss.) [2] было замечено, что измельчение свежесобранного (не высушенного) растительного материала и дальнейшее выделение гликозидов по классической схеме Кочеткова–Хорлина [3] приводит к существенному преобладанию в экстракте монодесмозидных гликозидов. Однако получение экстрактов из воздушно-сухого (предварительно высушенного перед измельчением) сырья дает сумму гликозидов с существенным преобладанием бисдесмозидных гликозидов. Очевидно, что наблюдаемый эффект можно объяснить тем, что в растительных тканях содержатся многочисленные ферменты, и в частности, гликозидазы, расщепляющие ацилгликозидную связь, что и приводит к превращению бисдесмозидных гликозидов в монодесмозидные (рис. 1).

Очевидно, что в растительных тканях данный фермент и гликозиды локализуются в различных местах и лишь при измельчении влажного сырья, а также механическом повреждении или значительном смятии влажного сырья, приводящем к разрушению тканей, наблюдается ферментолиз и, как следствие, увеличение количества монодесмозидных гликозидов. Измельчение же воздушно сухого сырья не приводит к ферментолизу, поскольку фермент действует только в водном растворе (или тканевой жидкости), а последующие обработки органическими растворителями и экстракция спиртом полностью денатурируют ферменты и не вызывают ферментативных превращений. Несомненно, что бисдесмозидные гликозиды являются нативной формой гликозидов во всех органах растения. Хотя наличие подобных ферментов в растениях и характер их действия на нативные гликозиды

известны достаточно давно [4, 5], но этому факту обычно не уделялось должного внимания.

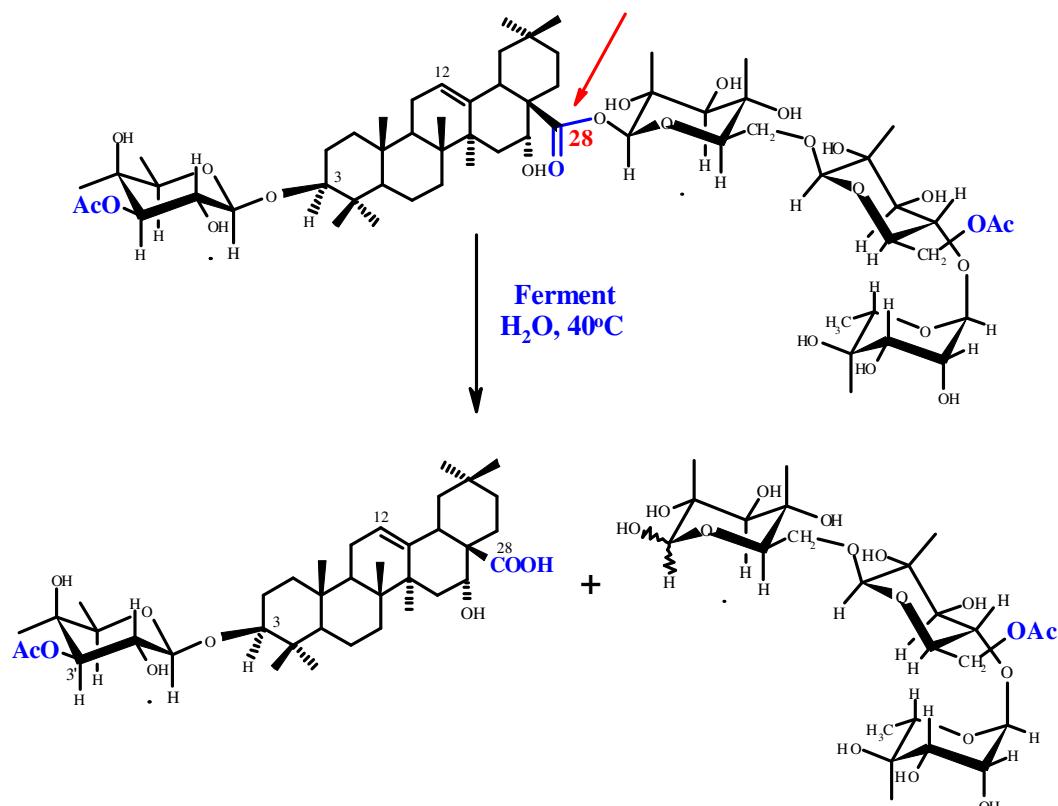


Рис. 1. Схема действия ацилгидролазы плюща.

Выделение суммарного ферментного препарата с ацилгидролазной активностью из листьев или плодов плюща проведено по методике, описанной в экспериментальной части и заключается в экстракции гомогенизированного растительного сырья водой и осаждении суммы водорастворимых белковых соединений с ферментной активностью безводным ацетоном, вызывающим лишь обратимую денатурацию ферментов, которые после выделения легко растворимы в воде.

Представлялось интересным детально изучить действие полученного ферментного препарата на ряд тритерпеновых гликозидов растений семейства Аралиевые. Выше указывалось, что данный фермент расщепляет ацилгликозидную связь и переводит бисдесмозидные гликозиды в монодесмозидные с углеводной цепью по С-3 атому агликона. Однако из литературных данных не было известно в какой форме отщепляется углеводный фрагмент по карбоксильной группе агликона (С-28) – полностью или в виде отдельных моносахаридов и какими еще видами ферментативной активности обладает полученный препарат.

Прежде всего, мы изучили действие полученного ферментного препарата на гликозидах с известной структурой [6]. При этом в результате ТСХ-анализа гидролизатов выяснилось, что фермент одинаково легко отщепляет любой углеводный фрагмент по карбоксильной группе агликона (одна глюкоза, остаток генциобиозы или трисахарида рамноза–глюкоза–глюкоза), причем удаляет его целиком и не расщепляет на отдельные моносахариды, что было доказано ТСХ-анализом продуктов ферментолиза. Никакими иными видами гликозидазной активности фермент не обладал, поскольку не наблюдались какие-либо изменения в структуре углеводной цепи по С-3 атому и получались лишь соответствующие исходным гликозидам прогенины.

Использование этого ферментного препарата представляет интерес, прежде всего, в установлении структуры углеводной цепи по С-28 атому агликона, поскольку при щелочном гидролизе отщепляемый фрагмент не может быть проанализирован вследствие его значительной деструкции, а ТСХ-анализ продуктов ферментолиза не представляет труда после осаждения фермента горячим спиртом (рис. 1). Таким образом, использование полученного ферментного препарата позволяет получать ценную информацию и о локализации сложноэфирных групп в той или иной углеводной цепи, которая не может быть столь легко получена какими-либо химическими методами.

В ходе работы было выяснено, что данный ферментный комплекс содержится в листьях и плодах и целого ряда других изученных видов плюща, в частности плюща обыкновенного (*Hedera helix* L.), плюща канарского (*Hedera canariensis* Willd.), плюща колхицкого (*Hedera colchica* K. Koch) и в растениях многих других изученных видов Аралиевых [2, 6].

Известно, что монодесмозидные гликозиды, в отличие от бисдесмозидных, обладают широким спектром цидных активностей, в частности показанных нами моллюскоцидной, антифунгальной и прочими [2, 7]. Очевидно, в растениях монодесмозидные гликозиды выполняют защитную функцию и предохраняют от поражения как животными, так и грибковыми паразитами, но образуются из практически неактивных бисдесмозидных гликозидов лишь при повреждении тканей растения паразитами, поскольку гликозиды и ферменты локализуются в разных частях клеток (тканей). Очевидно, что неактивная бисдесмозидная форма гликозидов защищает растение от самоотравления монодесмозидными гликозидами, возникающими лишь в ответ на внешние действие паразита при повреждении им тканей растения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Рассмотрено выделение и дана характеристика ферментного препарата из листьев и плодов видов растений рода плющ (*Hedera* L.).
2. Предложен простой способ выделения ферментного препарата, основанный на экстракции свежего растительного сырья водой с последующим осаждением белков (ферментов) ацетоном.

3. Проведена оценка и показана высокая специфичность действия ферментного препарата в отношении ацилгликозидной связи в тритерпеновых гликозидах растений семейства Аралиевые (Araliaceae Juss.).

Список литературы

1. Диксон М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб. – В 3-х т. – Пер. с англ. – Т.1-2. – М.: Мир, 1982. – 808 с.
2. Гришковец В. И. Тriterpenovye glikozidы araliyevykh: выделение, установление строения, биологическая активность и хемотаксономическое значение : Автореф. дис. ... д-ра хим. наук. / В. И. Гришковец. – Одесса. – 2004. – 36 с.
3. Хорлин А. Я. Химическое исследование тритерпеновых сапонинов : Авторефат дис. ... д-ра хим. наук / А. Я. Хорлин – Москва. – 1964. – 39 с.
4. Schlosser E. Role of saponins in antifungal resistance. II. The hederasaponins in leaves of English ivy / E. Schlosser // Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz. – 1973. – Vol. 80. – P. 704–710.
5. Domon B. New saponins from *Phytolacca dodecandra* L'Herit. / B. Domon, K. Hostettmann // Helv. Chim Acta. – 1984. – Vol. 67. – P. 1310–1315.
6. Гришковец В. И. Тriterpenovye glikozidы Araliyevykh: структуры выделенных тритерпеновых гликозидов / В. И. Гришковец, В. Я. Чирва, В. В. Качала [и др.] // Труды Никитского ботанического сада. – 2007. – Т. 128. – С. 90–102.
7. Hostettmann K. Saponins / K. Hostettmann, A. Marston. – Cambrige: Cambridge University Press, 1995. – 548 p.

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ENZYME PREPARATION
FROM LEAVES AND FRUITS OF PLANT SPECIES OF THE HEDERA GENUS
(*HEDERA* L.)**

Grishkovets V. I.

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russian Federation
E-mail: vladgri56@yandex.ru

The article discusses the isolation and characterization of an enzyme preparation from the leaves and fruits of plants of the genus *Hedera* (*Hedera* L.). A simple method for isolating the enzyme preparation is proposed, based on the extraction of fresh plant material with water, followed by the precipitation of proteins (enzymes) with acetone. The article evaluates and demonstrates the high specificity of the enzyme preparation in relation to the acylglycoside bond in the triterpene glycosides of plants in the Araliaceae family. It was found that the enzyme cleaves any carbohydrate fragment at the carboxyl group of the aglycone (either glucose, a genibiose residue, or a rhamnose-glucose-glucose trisaccharide) with equal ease, removing it entirely without breaking it into individual monosaccharides. The enzyme did not exhibit any other types of glycosidase activity. Moreover, it was found that if there are one or two acetate groups in the carbohydrate trisaccharide chain at C-28, they are also retained in the cleaved trisaccharide (easily detected by TLC). If the acetate group is located on the arabinose residue attached to the C-3 atom of the aglycone, it is also retained in the resulting progenin.

During the work, it was found that this enzyme complex is found in the leaves and fruits of a number of other studied species of ivy, including *Hedera helix* L., *Hedera canariensis* Willd., *Hedera colchica* K. Koch, and many other studied species of the Araliaceae family.

Keywords: Araliaceae, triterpene glycosides, enzymatic methods of analysis.

References

1. Dixon M. *Enzymes*, 808 p. (Mir, Moscow, 1982). (In Russ.)
2. Grishkovets V. I. *Triterpene glycosides of Araliaceae: isolation, structure determination, biological activity and chemotaxonomic significance*, Author's abstract of dissertation for academic degree of doctor of chemical sciences, 36 p. (Odessa, 2004). (in Ukr.).
3. Horlin A. Ya. *Chemical Research of Triterpene Saponins*, Author's abstract of dissertation for academic degree of doctor of chemical sciences, 39 p. (Moscow, 1964). (in Russ.).
4. Schlosser E. Role of saponins in antifungal resistance. II. The hederasaponins in leaves of English ivy, Z. *Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, **80**, 704 (1973).
5. Domon B., Hostettmann K., New saponins from *Phytolacca dodecandra* L'HERIT., *Helv. Chim Acta*, **67**, 1310 (1984).
6. Grishkovets V. I., Chirva V. Ya., Kachala V. V., Shashkov A. S. Triterpene Glycosides of the Araliaceae: Structures of the Isolated Triterpene Glycosides, *Proceedings of the Nikitsky Botanical Garden*, **128**, 90 (2007). (in Russ.).
7. Hostettmann K., Marston A., *Saponins*, 548 p. (Cambridge University Press, Cambridge, 1995).