

## ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА СРЕДЫ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ ШИКИМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ *REYNOUTRIA SACHALINENSIS*

А.А. Серeda, С.А. Бондарев, Е.Р. Никонорова, Т.А. Кроль

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных  
и ароматических растений, Москва, Россия, e-mail: gatiatulinaer@gmail.com

**Аннотация.** В данной работе проведено исследование по оптимизации методики выделения шикиматдегидрогеназы (ШДГ) из листьев *R. sachalinensis* с использованием различных сред для экстракции: контрольной и модифицированных – с 1% тритоном или 20% глицеролом. Наибольшая активность ШДГ была при использовании 20% глицерола. Очистка ацетоном снижала эффективность экстракции, что требует дополнительного исследования.

**Ключевые слова:** шикиматдегидрогеназа, экстракция, *Reynoutria sachalinensis*, глицерол, активность фермента

## OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPOSITION FOR SHIKIMATE DEHYDROGENASE EXTRACTION FROM REYNOUTRIA SACHALINENSIS LEAVES

A.A. Sereda, S.A. Bondarev, E.R. Nikonorova, T.A. Krol.

All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow, Russia,  
e-mail: gatiatulinaer@gmail.com

**Abstract.** This study focuses on optimizing the extraction method for shikimate dehydrogenase (SDH) from the leaves of *R. sachalinensis* by employing different extraction media: a control medium, and media modified with 1% Triton or 20% glycerol. The highest SDH activity was observed with 20% glycerol. However, acetone purification reduced extraction efficiency, necessitating further investigation.

**Keywords:** shikimate dehydrogenase, extraction, *Reynoutria sachalinensis*, glycerol, enzyme activity.

**Введение.** Одним из видов растений, содержащих в себе богатый комплекс различных биологически активных веществ (БАВ), является рейнутрия сахалинская (*Reynoutria sachalinensis*). Листья *R. sachalinensis* содержат ряд фенольных соединений, в том числе конденсированные танины [1]. В литературе показаны перспективы интродукции, хозяйственного использования *R. sachalinensis* как кормовой, медоносной культуры и источника фенольных соединений с антиоксидантными, индуцирующими фунгицидную активность свойствами, поэтому изучение синтеза и накопления фенольных соединений в данном виде является перспективной задачей.

Синтез фенольных соединений идёт преимущественно по шикиматному пути, конечный продукт которого – хоризмат, далее преобразуется в ароматические аминокислоты: L-тирозин, L-триптофан и L-фенилаланин. L-фенилаланин является предшественником фенилпропаноидов и таких соединений как конденсированные танины, антоцианы, флавоноиды, изофлавоноиды, фенольные кислоты и др. Одним из ключевых ферментов шикиматного пути является шикиматдегидрогеназа (ШДГ), которая вместе с дегидрохинатдегидратазой образует комплекс и является НАДФ-зависимым ферментом. ШДГ катализирует реакцию обратимого восстановления 3-дегидрошикимата в шикимат [2]. Соответственно, зная механизмы регуляции ШДГ, можно повысить содержание целевых веществ в растении и ценность сырья. Однако, подобного рода работы невозможны без выделения ферментов из растительных тканей.

Используемые для выделения ферментов экстрагенты, физико-механические воздействия и условия среды экстракции должны быть щадящими и не нарушать их нативную конформа-

цию. Для максимизации выхода белков из растительной ткани в экстракт необходимо разрушить мембраны и клеточные стенки, для чего используют механическое воздействие: измельчение в ступке, при помощи гомогенизатора или ультразвука. Также используются детергенты, нарушающие структуру липидного бислоя, например, алкилфенолгидроксиполиэтилен (Triton X-100), полисорбат -80 (Tween-80) и др. [3]. Сохранению активности ферментов в полученном экстракте препятствует ряд факторов, а именно наличие протеаз, высвобождающихся при разрушении клеточной структуры и способных гидролизовать пептидные связи белка. Поэтому при экстракции используются ингибиторы протеаз, такие как бензамидин, фенилметилсульфонилфторид (PMSF) и др. Фенольные соединения, присутствующие в экстракте, в результате окисления под действием кислорода воздуха, присутствия тяжелых металлов и др. способны ковалентно связываться с белками, взаимодействовать с реакционно-способными группами и вызывать агрегацию белка. В результате ферменты изменяют свою конфигурацию и утрачивают биологическую активность. Чтобы предотвратить связывание с фенольными соединениями, такими как танины и олигомеры катехина, используют адсорбирующие полимеры поливинилпирролидон (PVP), нерастворимый поливинилполипирролидон (PVPP) или ионообменные смолы, такие как DOWEX, XAD-4 и др. [3].

Состав сред для экстракции ШДГ широко варьируется в зависимости от видов и органов растений. Однако, в настоящее время недостаточно данных об активности и особенностях выделения ШДГ, в том числе из листьев растений *R. sachalinensis*. Таким образом, целью данного исследования была оптимизация состава среды для выделения ШДГ из листьев *R. sachalinensis*.

**Материалы и методы.** Объектом исследования были листья *R. sachalinensis*, которая входят в коллекцию ботанического сада ФБГНУ ВИЛАР. Листья хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения экстракции.

Образцы измельчали при помощи ступки в жидком азоте, после чего перемещали в охлажденную коническую пробирку типа Falcon и на льду добавляли охлажденную до  $4^{\circ}\text{C}$  среду для экстракции в соотношении 1:5. В данном исследовании использовали три варианта среды для экстракции: 1) контрольную (контроль); 2) контрольную с добавлением 20% глицерола (глицерол) и 3) контрольную с 1% тритоном (тритон). Контрольная среда для экстракции состояла из 0,2 М Трис-НСl буфера (рН=7,4), содержащего 2 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF, 1 мМ бензамидина, 10 мМ дитиотреитола (ДТТ), 3% XAD-4 и 5% PVP [4]. Используя погружной блендер (Dlab D-160, Китай), трижды проводили гомогенизацию по 15-20 сек., полученный экстракт фильтровали и центрифугировали при 14000 об/мин и  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин. (5427R, Eppendorf, Германия). Надосадочную жидкость, которую обозначали как неочищенный экстракт, аликвотировали по 0,5 мл. Половину неочищенного экстракта замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего исследования содержания белков и активности фермента, а во второй половине образцов проводили выделение белка методом осаждения ацетоном.

Осаждение белка проводили охлажденным до  $-20^{\circ}\text{C}$  ацетоном с добавлением 1 мМ ДТТ на льду: к 0,5 мл экстракта быстро приливали необходимый объем ацетона до насыщения 60%, смесь быстро перемешивали и центрифугировали при 14000 об./мин. в течение 3 мин. при  $4^{\circ}\text{C}$ . Надосадочную жидкость аккуратно сливали, а осадок белка в среде с тритоном трижды промывали 100% ацетоном, содержащим 1 мМ ДТТ. В контроле и среде с глицеролом осадок белка не промывали из-за его минимального количества и светлого цвета, не требующего доочистки от пигмента. Остаток ацетона удаляли, осадок белка растворяли в буфере 0,2 М Трис-НСl (рН=7,4), 2 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ (очищенный экстракт). Получившийся очищенный экстракт замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Содержание белка определяли методом Брэдфорда.

Анализ активности ШДГ проводился следующим способом: реакционная смесь объемом 0,5 мл содержала 20 мкл раствора образца, 4 мМ НАДФ<sup>+</sup> и 8 мМ шикимовой кислоты и 0,2 М Глицин-NaOH буфера при рН=10,2. Активность фермента ШДГ определяли на планшетном спектрофотометре (SPECTROstar NANO, BMG LABTECH, Германия) и рассчитывали по скорости увеличения оптической плотности при 340 нм и выражали в нкат/мг<sup>-1</sup> белка.

Анализ полученных данных выполнен с использованием R Studio (версия 023.09.1+494) и языка программирования R (версия 4.3.2). Распределение данных оценивали при помощи теста Шапиро-Уилка. Сравнение групп проводили методом Краскелла-Уоллиса, при выявлении достоверных различий проводили попарное сравнение при помощи теста Данна с поправкой Бонферрони на множественность сравнений. Различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В результате работы были получены образцы неочищенного и очищенного экстрактов при использовании контрольной и модифицированных сред для экстракции (Рисунок 1).

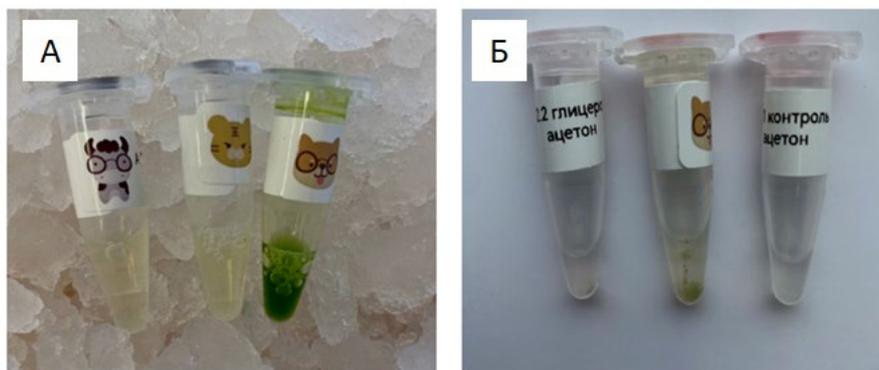


Рисунок 1 – Пример экстрактов, полученных из листьев *R. sachalinensis* (слева направо): А – неочищенный экстракт: контроль, глицерол, тритон; Б – очищенный экстракт: глицерол, тритон, контроль

Затем в образцах было определено содержание белка методом Брэдфорда и активность ШДГ (Таблица 1).

Таблица 1. Активность ШДГ и содержание белка в очищенных и неочищенных экстрактах при использовании различных сред для экстракции

| Показатель  | Контроль, N = 17  | Глицерол, N = 15   | Тритон, N = 9      | p      |
|---|-------------------|--------------------|--------------------|--------|
| <b>Неочищенный экстракт</b>   |                   |                    |                    |        |
| Активность, нкат/мг белка   | 3,90 (2,6-5,7)    | 7,70 (5,8-9,8) *   | 1,30 (0,7-3,1)*°   | <0,001 |
| Белок, мкг/мл экстракта   | 0,16 (0,14-0,18)  | 0,09 (0,08-0,11) * | 0,95 (0,52-1,09)*° | <0,001 |
| <b>Очищенный экстракт</b>   |                   |                    |                    |        |
| Активность, нкат/мг <sup>-1</sup> белка                                   | 1,68 (1,37-1,91)# | 1,86 (0,26-3,66)#  | 1,00 (0,79-1,29)   | 0,2    |
| Белок, мг/мл экстракта  | 0,16 (0,11- 0,20) | 0,08 (0,05-0,09)*  | 0,82 (0,68-0,85)*° | <0,001 |
| Данные представлены в виде медианы (25-75 перцентилей)                    |                   |                    |                    |        |
| * – различия достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$              |                   |                    |                    |        |
| ° – различия достоверны по сравнению с группой глицерол, $p < 0,05$       |                   |                    |                    |        |
| # – различия достоверны по сравнению с неочищенным экстрактом, $p < 0,05$ |                   |                    |                    |        |

Как видно из таблицы 1, в неочищенном экстракте содержание белка в контрольных образцах было в 1,7 раз выше ( $p=0,007$ ), чем в образцах с глицеролом и в 6 раз ниже ( $p=0,002$ ), чем в образцах с тритоном. При этом, самая высокая активность ШДГ была выявлена при использовании среды с 20% глицеролом: на 49% выше ( $p=0,015$ ) уровня контроля и в 6 раз выше ( $p < 0,001$ ), чем при использовании среды с 1% тритоном. Образцы с тритоном, несмотря на высокое содержание белка, показали низкую активность фермента.

В очищенных экстрактах были выявлены различия в содержании белка: наибольшее количество белка было выявлено при использовании среды для экстракции с тритоном, которое в 5,1 ( $p=0,005$ ) и 10,2 раз ( $p<0,001$ ) превышало таковые значения в контроле и глицероле, соответственно. При этом, не было выявлено различий в активности ШДГ ( $p=0,2$ ).

При сравнении содержания белка в неочищенном и очищенном экстракте не было выявлено достоверных различий. При этом активность фермента существенно различалась между группами ( $p<0,001$ ). Так, в контрольной группе активность ШДГ после очистки ацетоном снизилась в 2,3 раза ( $p<0,001$ ), а при использовании среды с глицеролом – в 4,1 раза ( $p<0,001$ ). Однако, на активность ШДГ в среде с тритоном очистка значимо не повлияла ( $p=0,470$ ).

В результате проведенного исследования было выявлено, что использование 20% глицерола в составе среды для экстракции было наиболее эффективно для сохранения активности фермента. Более высокая активность ШДГ при низком содержании белка по сравнению с другими вариантами среды для экстракции может быть объяснена свойством этого соединения стабилизировать белок, сохраняя нативные свойства ферментов. Предположительный механизм стабилизации описан в работе В. Вагененде и соавт. [5]. Снижение активности после очистки ацетоном, вероятно, связано с тем, что в процессе осаждения глицерол полностью удаляется из экстракта.

Добавление 1% тритона к среде для экстракции привело к максимальному выходу белка, вероятно, высвобожденного при разрушении детергентом клеточных мембран. Также имеются данные о способности тритона сохранять белки в солюбилизированном и функциональном состоянии [3]. Однако, нами было выявлено, что тритон отличался по активности ШДГ от других вариантов в худшую сторону, что вероятнее всего связано с особенностью расчёта активности фермента, при котором производится перерасчет на количество белка в образце (нкат/на  $\text{мг}^{-1}$  белка).

Большинство исследований активности ШДГ в растительных образцах проводили без дополнительной очистки и осаждения ацетоном, несмотря на то, что это может удалить максимальное количество липидов, пигментов и фенольных соединений и облегчить анализ при высокой цветности грубого экстракта и низком количестве белка. В нашем предыдущем исследовании о применимости метода ацетонового осаждения белка из неочищенных экстрактов листьев облепихи крушиновидной и свидины шелковистой было выявлено, что очищенный экстракт, полученный при добавлении ацетона до 60% насыщения, был наиболее удобен в работе, имел высокую активность фермента, не содержал окрашенных примесей, но общее содержание белка было меньше, чем в неочищенном экстракте [4]. При этом, относительная активность ШДГ в очищенном экстракте не отличалась от неочищенного экстракта или превосходила его [4]. В то же самое время, в настоящем исследовании содержание белка в очищенном экстракте не отличалось от неочищенного экстракта, а ферментативная активность снизилась после осаждения ацетоном в 2,3 раза.

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что на исследование активности ферментов могли повлиять видоспецифические особенности растительного сырья. Добавление глицерола к среде экстракции наиболее эффективно при изучении активности ШДГ в листьях данного вида. Однако, тот факт, что последующее осаждение нивелировало различия, говорит о том, что необходимы дальнейшие исследования по оптимизации выделения и исследования активности ШДГ из листьев *R.sachalinensis*. Так, возможно, что глицерол критичен для стабильности ШДГ и необходимо изменение состава буфера для растворения белка путем добавления в него глицерола. Также, в связи с необходимостью заморозки проб до проведения исследования, состав буфера может играть важную роль. Например, известно, что различные буферные системы меняют значение рН при изменении температуры, суммарный сдвиг рН при температуре от + 25 до - 30°C может составлять от 0,3 до 1,1 в зависимости от буфера. Можно предположить, что снижение активности в очищенном экстракте было вызвано составом буфера для растворения на основе Трис-НСI и его замена на другой предотвратит снижение активности фермента – однако, отсутствие различий при использовании среды с тритоном не позволяет однозначно подтвердить данный факт.

**Заключение.** Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что наиболее эффективной для экстракции ШДГ из листьев *R. sachalinensis* являлась среда с добавлением 20% глицерола. В результате чего активность ШДГ увеличилась на 49% по сравнению с контролем и в 6 раз, по сравнению с использованием среды с 1% тритоном. Показано, что очистка ацетоном снижала эффективность экстракции, однако причина такого эффекта требует дополнительного исследования. Данное исследование позволит проводить более точные исследования активности ШДГ в различных видах растений, в том числе богатых фенольными соединениями.

Финансирование: Работа выполнена согласно Государственному заданию по теме FGUU 2022–0013

#### **Библиографический список**

1. Bensa M., Glavnik V., Vovk I. Leaves of invasive plants—Japanese, Bohemian and giant knotweed—the promising new source of flavan-3-ols and proanthocyanidins // *Plants*. – 2020. – Т. 9. – №. 1. – С. 118.
2. Shende V. V., Bauman K. D., Moore B. S. The shikimate pathway: gateway to metabolic diversity // *Natural Product Reports*. – 2024.
3. Pierpoint W. S. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds // *Protein purification protocols*. – 2004. – С. 65-74.
4. Никонорова Е. Р., Балеев Д. Н. Применение метода осаждения белка ацетоном для определения активности ферментов лекарственных растений // *Химия растительного сырья*. – 2023. – №. 4. – С. 111-117.
5. Vagenende V., Yap M. G. S., Trout B. L. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol // *Biochemistry*. – 2009. – Т. 48. – №. 46. – С. 11084-11096.