

УДК: 557.152.31:635.8

С.Л. Міресь, Л.Ф. Дьяченко, Н.С. Бобрешова, О.С. Багаєва,
В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: till2002@mail.ru

ЕКСПРЕСИВНІСТЬ ІЗОФОРМ КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗИ *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P. KARST ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ НА СЕРЕДОВИЩАХ РІЗНОГО СКЛАДУ

За допомоги методу електрофоретичного розподілу в поліакриламідному гелі було досліджено експресію ізоформ карбоксилестерази міцелію *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst) зрощеного на різних середовищах. Найбільша кількість ізоформ з найвищою експресивністю була визначена у зерновому міцелії, отриманому на вівсяному субстраті. В міцеліальній культурі, отриманій на рідкому середовищі, виявлено від трьох до шести ізоформ залежно від субстратної композиції. У міцелії з щільного середовища сусло-агар виявлено дві активні ізоформи ферменту.

Ключові слова: ізоформи карбоксилестерази, *Ganoderma lucidum*.

Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst) відомий як лікарський гриб вже більше двох тисяч років. Його активно культивують для отримання біологічно активних добавок [1–4]. Вирощування даної культури в штучних умовах пов'язане з низкою труднощів, а саме з високим ступенем варіабельності залежно від складу субстрату та умов культивування [5], що яскраво відображається на морфологічних ознаках плодового тіла. Цей факт, очевидно, обумовлений зміною активності ферментних систем, що може впливати і на якості лікарських властивостей гриба. Про зміни, що відбуваються на ферментативному рівні, ми можемо судити вивчаючи поліморфізм молекулярних форм деяких ферментів, що добре ідентифікуються. Таким маркерним ферментом для *Ganoderma lucidum* може служити карбоксилестераза. Цей фермент каталізує гідроліз складних ефірів, дає при електрофоретичному розділенні чітко розподіленні спектри множинних молекулярних форм [6, 7], тому може бути використаний в оцінці модифікаційної мінливості гриба.

© С.Л. Міресь, Л.Ф. Дьяченко, Н.С. Бобрешова, О.С. Багаєва, В.О. Іваниця, 2011



Метою даної роботи було вивчення мінливості спектрів множинних молекулярних форм карбоксилестерази *Ganoderma lucidum* залежно від умов культивування. У зв'язку з поставленою метою розв'язувалися такі задачі: отримати екстракти з міцелію *Ganoderma lucidum*, зрощеного на різних видах субстратів — твердому агаризованому, рідкому та на зерні, провести електрофоретичний розподіл множинних молекулярних форм карбоксилестерази та визначити експресивність окремих ізоформ ферменту.

Матеріали і методи

У роботі використовували штам *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. Інституту сільськогосподарської генетики (м. Ханой).

Таблиця 1

Склад поживних середовищ

Table 1

Composition of the nourishing substrats

Спосіб культивування	Варіант	Склад середовища
Культивування на поверхні щільного середовища	1	сусло-агар
Глибинне культивування	2	дріжджовий екстракт — 10 г, FeSO ₄ · 7H ₂ O — 13 мг, ZnSO ₄ · 7H ₂ O — 4 мг, вода — до 1 л pH = 5,2
	3	гречане борошно — 2%, вода — до 1 л pH = 5,2
	4	вівсяне борошно — 2 %, вода — до 1 л pH = 5,2
Культивування на зерні	5	Пшениця — 1 кг, крейда — 30 г, гіпс — 120 г, вода — 2 л
	6	Овес — 1 кг, крейда — 30 г, гіпс — 120 г, вода — 2 л
	7	Ячмінь — 1кг, крейда — 30 г, гіпс — 120 г, вода — 2 л

Міцелій, що було отримано вищезазначеними способами культивування (табл. 1), вносили у 0,1 М гліцин-NaOH буфер, з 1% тритона X-100, обробляли методом заморожування-відтавання і розтиранням в ступці на холоді, після чого проби центрифугували на холоді при 10000 г протягом 15 хв. Досліджувані екстракти стандартизували за масою міцелію.

Електрофоретичне розділення молекулярних форм карбоксилестерази проводили в 7% поліакриламідному гелі. Після електрофоретичного розділення відмиті блоки гелів інкубували в 0,1 М тріс-гліциновому буфері рН 7,4, що містить діазоній і 25 мг β-нафтилпропіоната, який використовували як субстрат.



Одержані електрофореграми сканували і аналізували за допомоги спеціальної ліцензійної комп'ютерної програми «АнаИС», визначали показник Rf , кількість одержаних ізоформ і експресивність, яку виражали у відносних одиницях оптичної щільності (ΔD_o) забарвлених кінцевим продуктом реакції ферментативних зон. Експеримент проводили в триразовій повторності. Статистичне опрацювання первинних даних проводили згідно [8] з використанням непараметричного критерію Уїлкоксона.

У роботі використовували реактиви фірм «Reanal» (Угорщина), «Chemapol» (Чехія), «Fergak» (Німеччина), а також установку для вертикально-пластинчатого електрофорезу марки «VE-4» російського виробництва.

Результати та їх обговорення

Дослідження множинних молекулярних форм (ММФ) карбоксилестерази міцелію *Ganoderma lucidum*, узятого з різних культур, показало що їх кількість та експресивність значно різняться залежно від умов культивування та складу поживного середовища (рис. 1).

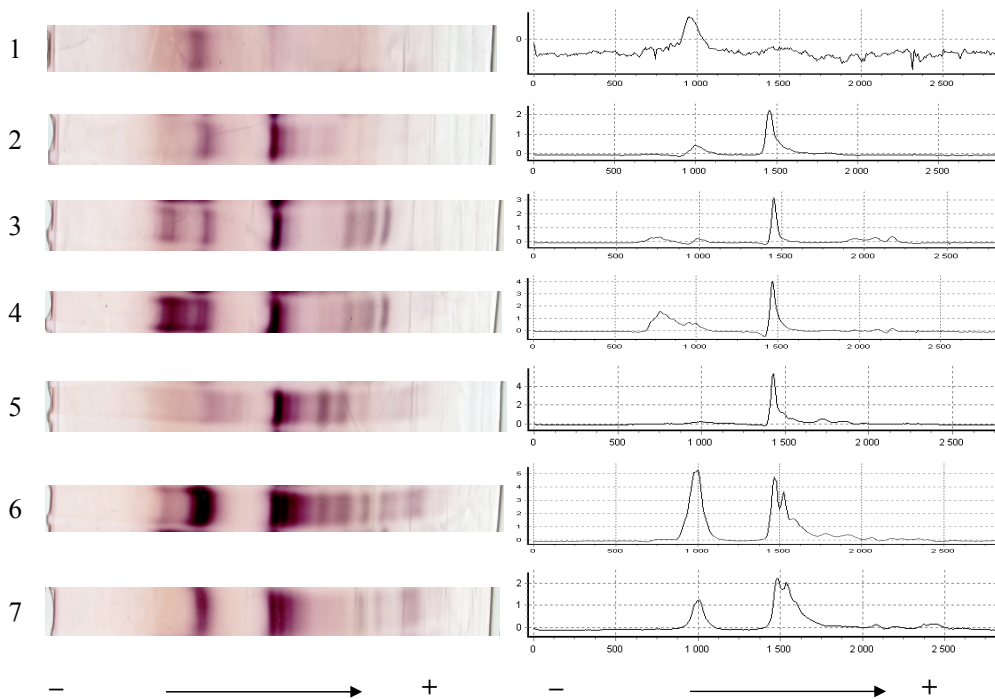


Рис.1. Електрофореграми досліджуваних зразків міцелію *Ganoderma lucidum*

Fig. 1. Electrophorogrammes of the varieties of mycelium *Ganoderma lucidum*

Як видно з наведених електрофореграм найменша кількість смуг (2 ізоформи), що відповідають різним молекулярним формам ферменту, спостерігалася у варіанті з культивуванням міцелію на щільному середовищі — сусло-агарі, найбільша кількість (9 ізоформ) була визначена у шостому варіанті (зерновий міцелій, отриманий на вівсяному субстраті). Інші види зернового міцелію вирощеного на пшениці та ячмені мали по 6 і 7 ізоформ, відповідно.

Отримана на рідкому середовищі культура гриба мала наступний спектр ММФ: з додаванням дріжджового екстракту — 3 смуги, на гречаному і вівсяному борошні — по 6 смуг.

Результати денситометрії електрофореграм наведено у табл. 2. З двох ізоформ, що детектуються при електрофорезі міцелію, зрощеного на сусло-агарі, більш активна повільно мігруюча форма з відносною рухливістю R_f 0,350 (74% всієї експресивності), середньорухлива форма з R_f 0,510 у 2,8 разів є менш активною.

Таблиця 2

Експресивність ізоформ естерази *G. lucidum* при культивуванні на різних середовищах, ΔD

Table 2

Expressions of esterase isoforms of *G. lucidum* at cultivation on different substrats, ΔD

Rf Варіант	0,270	0,350	0,400	0,510	0,530	0,610	0,650	0,710	0,760	0,820	Σ
1	—	0,139	—	0,048	—	—	—	—	—	—	0,187
2	—	0,422	—	2,200	0,263	—	—	—	—	—	2,885
3	0,685	0,216	—	3,170	—	—	0,211	0,286	0,351	—	4,919
4	1,570	0,578	—	3,950	—	—	0,012	0,089	0,190	—	6,389
5	—	0,218	0,094	5,260	0,561	0,513	0,285	0,057	—	—	6,988
6	0,380	5,270	—	4,820	3,670	0,480	0,390	0,182	0,131	0,192	15,515
7	—	1,250	—	2,210	2,020	—	—	0,145	0,064	0,179	5,868

На електрофореграмах міцелію, одержаного при глибинному культивуванні *G. lucidum* на дріжджовому екстракті за відносною рухливістю ідентифікується тільки 3 ізоформи (R_f 0,350; 0,510; 0,650). Найбільш активна ізоформа з R_f 0,510 (76% всієї експресивності). У двох інших варіантах, при використанні гречаного та вівсяного борошна, ідентифікується по 6 форм естерази (R_f 0,270; 0,350; 0,510; 0,650; 0,710; 0,760), які відрізняються своєю експресивністю залежно від складу середовища. Найбільшу експресивність в обох варіантах має також середньорухлива форма з R_f 0,510 (64% та 61%, відповідно).



У зерновому міцелії гриба визначається від 6 до 9 форм карбоксилестерази. Електрофореграми ізоформ ферменту при використанні як середовища зерна пшениці (варіант 5) відрізняються від електрофореграм при культивуванні на інших поживних середовищах присутністю ізоформи з відносною рухливістю 0,400.

В міцелії гриба, вирощеного на зерні ячменю (варіант 7), детектується 6 форм естерази, проте дві з них (R_f 0,760 і 0,820) мають іншу відносну рухливість, ніж у варіанті з пшеницею. Найбільша експресивність у варіантах 5 та 7 характерна для середньорухливої ізоформи з R_f 0,510.

Електрофореграми зернового міцелію, отриманого на вівсі (варіант 6), налічують найбільшу кількість ММФ карбоксилестерази, відрізняються однією малорухливою формою (R_f 0,270) і найбільшою експресивністю ізоформи з R_f 0,350.

Сумарна експресивність ферменту також залежить від середовища культивування ганодерми. Математичне опрацювання результатів показало, що на статистичному рівні значущості $p < 0,05$ значення сумарної експресивності карбоксилестерази досліджуваних варіантів розрізняються між собою (у всіх можливих варіантах порівняння критерій $U_{\text{факт.}} = 0$).

Мінімальна експресія естерази у міцелію спостерігається при культивуванні його на щільному середовищі сусло-агар (0,187 відн.од).

Серед варіантів глибинного культивування якнайменшу сумарну експресивність карбоксилестерази має варіант 2 (з дріжджовим екстрактом) — 2,885 відн.од. Вирощування на гречаному борошні підвищує експресивність карбоксилестерази міцелію у 1,7 разу (до 4,919 відн.од), а вирощування на вівсяному борошні — у 2,2 разу (до 6,389 відн.од) порівняно з використанням дріжджового екстракту.

У зерновому міцелію найменша ферментативна активність естерази спостерігалася у варіанті 7 з використанням ячменю (5,868 відн.од). При заміні його на пшеницю експресія зростала на 19% (до 6,989 відн.од), а у присутності вівса — в 2,6 разу (до 15,515 відн.од).

Таким чином, нами було встановлено, що у міцелії *Ganoderma lucidum* детектується до 10 ізоформ карбоксилестерази, серед яких одночасно можуть проявляти свою активність від 2 до 9 в залежності від умов вирощування. Максимальна кількість ізоформ карбоксилестерази (9) та, відповідно, й максимальна експресивність ферменту (15,515 відн.од) спостерігається при вирощуванні гриба на вівсяному зерновому субстраті. Дві середньорухливі форми ферменту з відносною рухливістю R_f 0,350 та 0,510 визначаються у всіх варіантах незалежно від способу культивування та складу поживного середовища. Зважаючи на функції карбоксилестерази в грибному організмі, а саме гідроліз амідних та ефірних зв'язків полімерних молекул [9-11], можна припустити, що підвищена експресивність цього ферменту та збільшення кількості ізоформ пов'язано із ступенем і швидкістю засвоювання субстрату та адаптивними властивостями міцелію гриба. Які саме з визначених нами форм ферменту є продуктами різних



генів, а які набувають відмінності на посттрансляційному рівні ми поки що говорити не можемо, тому всі детектовані електрофоретичні варіанти карбоксилестерази в проведеному дослідженні визначали як ізоформи.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Stamets P.* Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. — Oxford, 1993. — 552 p.
2. *Wasser S., Weis A.* Medicinal Mushrooms. Reishi Mushroom (*Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst). — Haifa, 1997. — 39 p.
3. *Willard T.* Reishi mushroom: herb of spiritual potency and medical wonder. — Issaquah, Washington: Sylvan Press. 1990. — 167 p.
4. *Щерба В.В., Бабицкая В.Г.* Полисахариды ксилотрофных базидиомицетов // Прикл. биохим. и микробиол. — 2008. — Т. 44, № 1. — С. 90–85.
5. *Постнова Е.Л.* Исследование внутреннего полиморфизма штаммов *Ganoderma lucidum* (W. Curtis:Fr.) P. Karst.: дис. на соиск. науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.24. — Москва, 2009. — 23 с.
6. *Мирось С.Л., Андриевский А.М.* Содержание белка и экспрессия множественных молекулярных форм карбоксиэстераз в тканях трутовика лакированного (*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.) // Тези доповідей молодих вчених. Матеріали II Міжнародної конф. «Біологія: від молекули до біосфери». — Харків, 19-21 листопада 2007 р. — С. 358.
7. *Мирось С.Л., Андриєвський А.М.* Молекулярні форми карбоксиэстераз трутовика лакованого (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.) // Аграрний вісник причорномор'я. Зб.наук.праць. — 2008. — вип. 46. — С. 29–35.
8. *Атраментова Л.О., Утевська О.М.* Статистичні методи в біології: Підручник. — Х.: ХНУ, 2007. — 288 с.
9. *Satoh T., Hosokawa M.* Structure, function and regulation of carboxylesterases // Chem. Biol. Interact. — 2006. — № 162. — P. 195–211.
10. *Smith B.J., Sivasithamparama K.* Isozymes of *Ganoderma* species from Australia // Mycological Research. — 2000. — V. 104, № 8. — P. 952–961.
11. *Zorn H., Bouws H., Takenberg M., Nimtz M., Getzlaff R., Breithaupt D.E., Berger R.G.* An extracellular carboxylesterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyses xanthophyll esters // Biol. Chem. — 2005. — V. 386, № 5. — P. 435–440.



С.Л. Мирсь, Л.Ф. Дьяченко, Н.С. Бобрешова, О.С. Багаева, В.А. Иваниця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: till2002@mail.ru

ЭКСПРЕССИВНОСТЬ ИЗОФОРМ КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗЫ *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P. KARST ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА

Реферат

С помощью метода электрофоретического распределения в полиакриламидном геле была исследована экспрессия изоформ карбоксилэстеразы мицелия *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, выращенного на средах разного состава. Наибольшее количество изоформ с наибольшей экспрессивностью было получено в зерновом мицелии, выращенном на овсяном субстрате. Мицелиальная культура, полученная на жидкой среде, давала от трёх до шести изоформ в зависимости от субстратной композиции. В мицелии, полученном на твердой среде сусло-агар было зарегистрировано две активные изоформы.

Ключевые слова: изоформы карбоксилэстеразы, *Ganoderma lucidum*.

S.L. Miros, L.F. Dyatchenko, N.S. Bobreshpova, O.S. Bagaeva,
V.O. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082,
Ukraine, e-mail: till2002@mail.ru

EXPRESSIONS OF CARBOXYLESTERASE ISOFORMS OF *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P. KARST IN DIFFERENT GROWING CONDITIONS

Summary

Using the method on the alkaline preliminary electrophoretical distribution in the polyacrylamide gel the expression of carboxylesterases isoforms of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst cultivation mycelium from the different substrates composition has been described. The most quantity (9) and the most expression of carboxylesterase isoforms (15,515) were detected in the mycelium from oat-grain substrate. In the case of *Ganoderma* liquid culture there were obtained from 3 to 6 isoforms depending on the substrate composition. The spawn has only two active isoforms of carboxylesterase.

Key words: isoforms of carboxylesterase, *Ganoderma lucidum*.

