

УДК: 557.152.31:635.8

С.Л. Міресь, Ю.Ю. Дуденко, Н.С. Бобрешова, Т.В. Гудзенко,
В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: kafgen@onu.edu.ua

ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ СПЕКТРИ КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗ *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P. KARST ЗАЛЕЖНО ВІД УМОВ ЕКСТРАГУВАННЯ ТА СУБСТРАТУ ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ

*За допомогою методу електрофоретичного розподілу в поліакриламідному гелі досліджено склад спектрів множинних молекулярних форм карбоксилестераз плодового тіла та міцелію гриба *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, який вирощували на середовищах з вівсом та ячменем. Визначено вплив складу та рН екстрагенту на виявлення ізоформ ферменту карбоксилестерази. Залежно від складу поживного середовища та умов екстрагування ферменту на електрофореграмах виявлено від 2 до 9 ізоформ карбоксилестераз. Константними множинними молекулярними формами карбоксилестераз, що визначалися у всіх варіантах, були дві середньорухливі ізоформи з Rf 0,380 та 0,510.*

*Ключові слова: *Ganoderma lucidum*, карбоксилестераза, спектр ізоформ, мінливість.*

Карбоксилестерази (КФ 3.1.1.1) — серинові гідролази широкого спектру дії, що каталізують гідроліз переважно аліфатичних і ароматичних ефірів нижчих жирних кислот, а також ефірів молочної, бурштинової та інших органічних кислот і багатьох амінокислот. Їх виявлено в клітинах бактерій, грибів, рослин та тварин [1]. У карбоксилестераз базидіомицетів встановлено також наявність ліпазної активності. За молекулярною будовою карбоксилестерази різних організмів дещо різняться. У базидіомицетів ця група ферментів має вісім субодиниць з загальною масою 430 кД [2]. Завдяки значній внутрішньовидовій мінливості та простоті гістохімічного виявлення [3] карбоксилестераз використовують як маркерний фермент у популяційно-генетичних дослідженнях та при ідентифікації організмів [4–10]. Поліморфізм карбоксилестераз вищих базидіомицетів вивчено мало. Разом з тим, отримана інформація може стати у нагоді при визначенні модифікаційної та генотипової мінливості грибів, особливостей формування їх цілющих властивостей залежно від умов вирощування, тощо.

© С.Л. Міресь, Ю.Ю. Дуденко, Н.С. Бобрешова, Т.В. Гудзенко, В.О. Іваниця, 2012



Метою роботи було вивчення складу електрофоретичних спектрів множинних молекулярних форм карбоксилестераз у лікарського базидіоміцета *Ganoderma lucidum* ((Curtis) P. Karst) за різних поживних середовищ та умов екстрагування ферменту.

Матеріали і методи

У роботі використовували штам *Ganoderma lucidum* ONU F101, отриманий з Інституту сільськогосподарської генетики (м. Ханой).

Вплив розчинника та рН середовища при екстрагуванні на спектр ізоформ карбоксилестераз досліджували на плодкових тілах трутовика лакованого, що були отримані при культивуванні міцелію на суміші соломи пшениці та ячменю. Гриб вирощували при температурі 22 °С (при переході до плодоношення — при 16 °С) і вологості повітря 90%. Фермент екстрагували розчинниками: гліцин — 0,1 М (рН 4,0); тріс-гліциновий буфер — 0,1 М (рН 7,4); гліцин-NaOH буфер — 0,1 М (рН 9,0); гліцин-NaOH буфер — 0,1 М, з доданням 1% тритону X-100 (рН 9,0). Проби свіжозібраного плодового тіла з розчинником розтирали у ступці на холоді у співвідношенні біомаса/розчинник (w/v) 1:5 .

Залежність експресії множинних молекулярних форм карбоксилестераз (ММФ) від виду субстрату досліджували на пробах отриманих з міцелію, який вирощували на субстраті з зернового ячменю та вівса:

Зерновий міцелій I
овес — 1 кг
крейда — 30 г
гіпс — 120 г
вода — 2 л

Зерновий міцелій II
ячмінь — 1 кг
крейда — 30 г
гіпс — 120 г
вода — 2 л

Із зібраного міцелію готували наважки по 100 мг, додавали по 100 мкл або 1000 мкл екстрагенту і гомогенізували так само, як плодові тіла. Для екстракції ММФ карбоксилестераз з міцелію використовували 0,1 М гліцин-NaOH буфер з 1% тритону X-100. Підготовлені таким чином проби центрифугували на холоді (+4 °С) при 10 000 g впродовж 15 хв, після чого піддавали заморожуванню-відтаюванню. Отримані таким чином екстракти піддавали електрофоретичному розділенню у 7% поліакриламідному гелі. ММФ карбоксилестераз виявляли за методикою Л.І. Корочкина [3] з модифікаціями [11].

Одержані електрофореграми сканували і аналізували за допомогою спеціальної ліцензійної комп'ютерної програми «АнаИС».

Результати та їх обговорення

Для дослідження залежності виявлення ММФ карбоксилестераз від складу екстрагента отримували свіжі плодові тіла трутовика лакованого. Для екстракції ММФ карбоксилестераз використовували три буфери із



різними значеннями рН та один — з доданням детергента тритон Х-100. Результати електрофорезу отриманих екстрактів ММФ карбоксилестераз плодового тіла трутовика лакованого представлено на рис. 1.

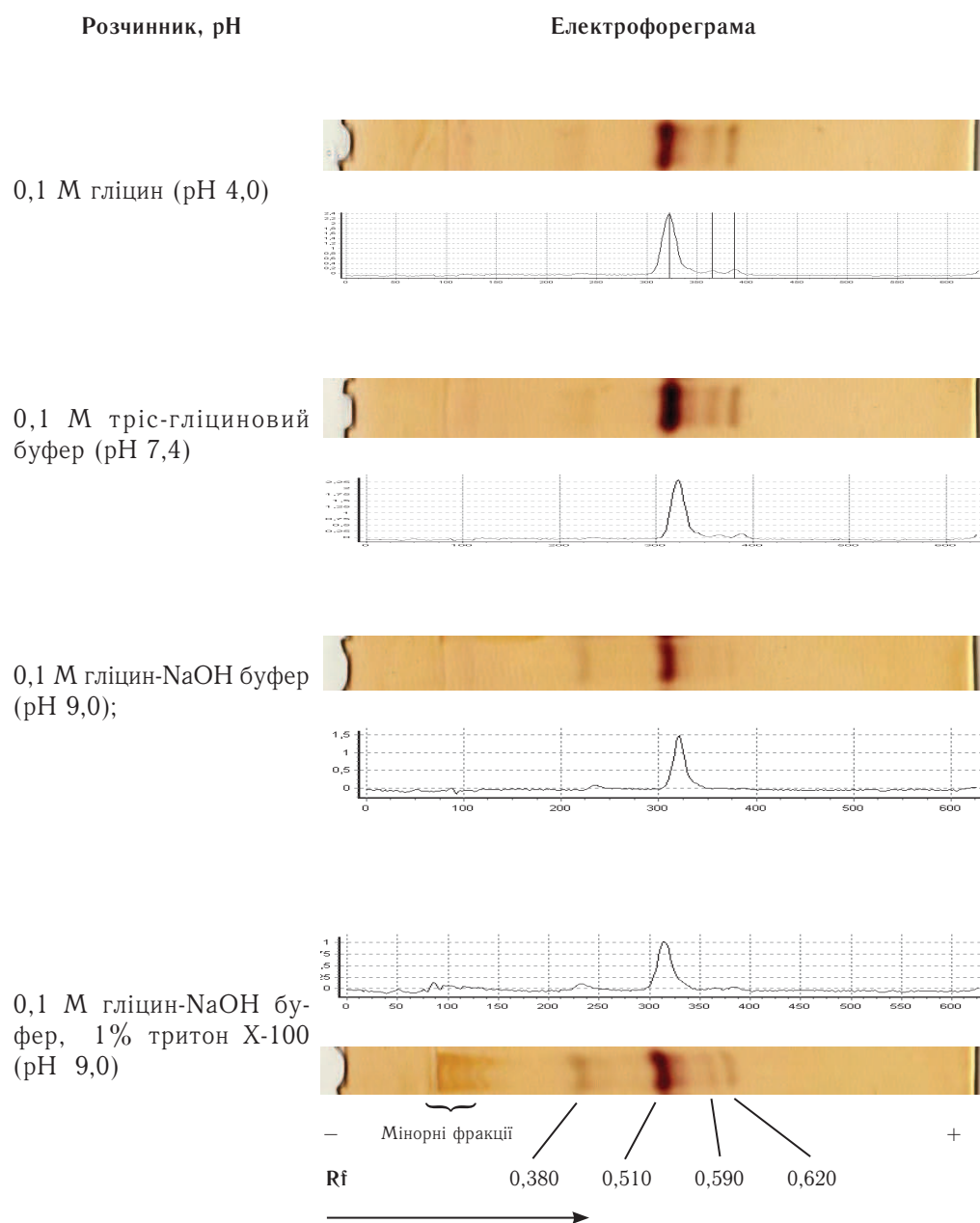


Рис. 1. Спектри ММФ карбоксилестераз плодових тіл *G. lucidum* за екстракції різними розчинниками

Fig. 1. The spectra of carboxylesterases molecular forms of *G. lucidum* fruit bodies extracted by different solvents

Як видно з електрофореграм у пробах з плодового тіла *Ganoderma lucidum* визначається до чотирьох основних ізоформ з відносною рухливістю 0,380; 0,510; 0,590; 0,620. Ступінь їх екстрагування залежить від складу розчинника і значення рН. Найкращі результати отримано для екстрагенту, що містить 0,1 М гліцин- NaOH буфер з доданням 1% тритону X-100 (рН 9,0). Цей склад розчинника дозволяє виявити також мінорні слабо рухливі форми карбоксилестераз.

В подальшому вивчали залежність експресивності множинних молекулярних форм карбоксилестераз міцелію від виду субстрату, на якому його вирощували, використовуючи як розчинник гліцин- NaOH буфер з тритоном у співвідношенні міцелій/розчинник (w/v) 1:10 та 1:1. Для цього зразки міцелію вирощеного на зерні вівса та ячменю гомогенізували та екстрагували ММФ карбоксилестераз.

Результати експресивності ММФ карбоксилестераз залежно від виду субстрату для вирощування міцелію гриба представлені на рис. 2.

Аналіз спектрів показав, що для екстракції карбоксилестерази з зернового міцелію кращим є співвідношення його з розчинником 1:1. Більше розведення (1:10) призводить до того, що частина ізоформ, вміст яких менший, не виявляються.

При порівнянні спектрів ММФ карбоксилестераз з міцелію, отриманого на різних субстратах, було виявлено їх відмінності. У міцелії, що культивувався на вівсяному середовищі детектовано найбільшу кількість ізоформ — дев'ять (з R_f 0,190; 0,380; 0,510; 0,520; 0,590; 0,620; 0,660; 0,720 та 0,800). У пробі міцелію отриманого з ячменю спостерігали експресію лише шести ММФ (відсутніми виявилися ізоформи з R_f 0,190; 0,590 та 0,620). Це може бути пов'язано з відмінностями хімічного складу зернового субстрату. Так, у вівсяному зерні міститься жирів у 2,5 рази, а клітковини у 2 рази більше ніж у зерні ячменю [12]. Ймовірно саме більша кількість жирів у вівсяному субстраті призводить до експресії більшої кількості ММФ карбоксилестераз. Відомо, що гриби можуть використовувати ліпіди як джерело вуглецю та енергії розщеплюючи їх за допомогою ліпаз. В результаті утворюються складні ефіри і альдегіди, які є субстратом для карбоксилестераз [13].

При порівнянні спектрів ММФ карбоксилестераз з міцелію та плодкових тіл також встановлено відмінності в кількості ізоформ цього ферменту. У пробах з плодового тіла їх нараховується до чотирьох. Спільними множинними молекулярними формами карбоксилестераз з плодового тіла і міцелію були ізоформи з відносною рухливістю 0,380 та 0,510. Решта, визначених у пробах з плодового тіла ММФ з R_f 0,590 та 0,620, була зафіксована лише у міцелії, що вирощували на вівсяному зерні. Встановлені відмінності в спектрах ММФ карбоксилестераз можуть бути обумовлені як складом субстрату для вирощування так і стадією розвитку гриба.

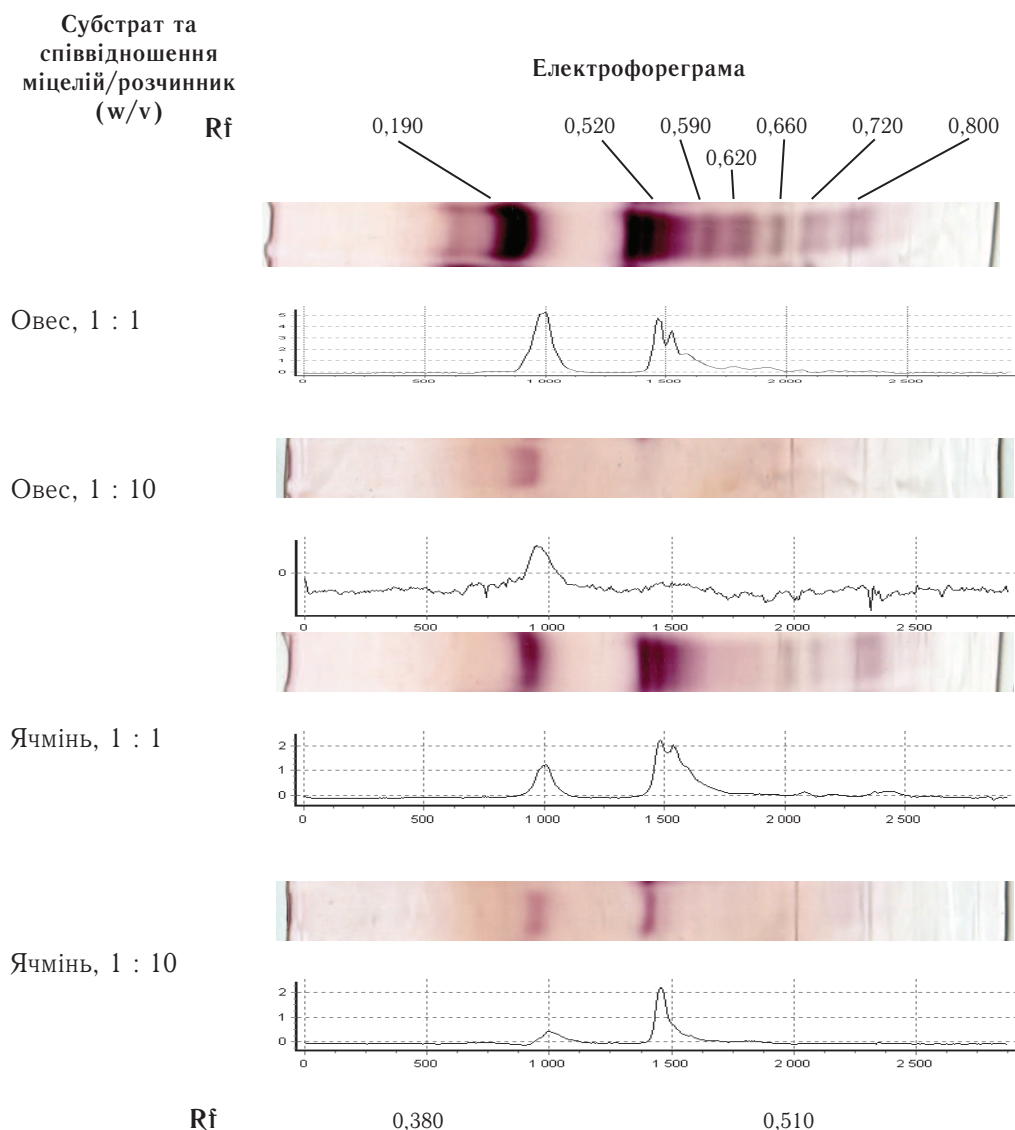


Рис. 2. Експресивність ММФ карбоксилестераз залежно від виду субстрату для вирощування міцелію гриба *G. lucidum*

Fig. 2. Expressivity of carboxylesterases molecular forms depending on the substrate for growing *G. lucidum* mushroom mycelium

Т. Tseng і L. Lay [14] при вирощуванні *G. lucidum* на рідкому середовищі, що містило солод, декстрозу та пептон визначили у міцелії 8 ізоформ карбоксилестераз. При цьому ферменти екстрагували фосфатним буфером з рН 6,5. С. Бойко виявив у диспоровій культури *G. lucidum* 8 ММФ цього ферменту, а у моноспоровій культури — лише 3 з низькою електрофоретичною рухливістю [9].

Визначення електрофоретичного спектру естераз грибів застосовують для встановлення таксономічного положення та належності до екологічних груп невідомих штамів [10, 14]. Проте, як показали наші дослідження, залежно від умов отримання міцелію та екстрагування спостерігається мінливість електрофоретичних спектрів ММФ карбоксилестераз у діапазоні від 2 до 9 ізоформ. Отже, мінливість, обумовлена механізмами регуляції експресії за різного складу поживного середовища, стадію розвитку гриба та умовами екстрагування ферментів, необхідно враховувати при застосуванні спектрів ММФ карбоксилестераз для таксономії та ідентифікації цих грибів. З цією метою можна рекомендувати визначені нами конститутивні форми ферменту, якими є середньорухливі ізоформи з Rf 0,380 та 0,510.

ЛІТЕРАТУРА

1. Албертс В., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Роберте К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М.: «Мир». 1987. — Т. 3. — С.107—110.
2. 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.
3. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И., Аронштам А.А., Боркин Л.Я., Малецкий С.И., Полякова Е.В., Манченко Г.П. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
4. Дворник В.Я., Михеенко И.П., Котов В.С. Генетическая дифференциация по локусам эстераз краевых популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на территории Украины // Цитология и генетика. — 1998. — Т. 32. — № 3. — P. 59—63.
5. Радионов Д.Б., Андриевский А.М., Хаустова Н.Д., Красносельская А.А. Анализ частот встречаемости генотипов и аллелей по локусу эстеразы в природных и лабораторных популяциях *Drosophila melanogaster* // Вісник ОНУ. — 2009. — Т. 14. — Вип. 8. — С. 54—60.
6. Godinho L.F., Reis C.R., Rozeboom H.J., Dekker F.J., Dijkstra B.W., Poelarends G.J., Quax W.J. Enhancement of the enantioselectivity of carboxylesterase A by structure-based mutagenesis // Journal of Biotechnology. — 2012. — № 158. — P. 36—43.
7. Серебров В.В., Алексеев А.А., Глухов В.В. Изменение активности и спектра эстераз гемолимфы гусениц воштинной моли *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) при микозах // Изв. АН. Сер. биол. 2001. — № 5. — С. 588—592.
8. Заморов В.В., Рыжко И.Л., Друзенко О.В. Полимофизм эстераз бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas) из акватории острова змеиный // Вестник ОНУ. — 2010. — Т. 15, Вып. 17. — С. 73—81.

9. Бойко С. М. Исследование внутриклеточных ферментных систем моноспоровых культур изолята *Irpex lacteus* Fr. // Immunology, Allergology, Infectology. — 2010. — № 10. — С.18.
10. Матросова Е.В. Цитологический и изоферментный анализ видов рода *Agaricus* Fr. emend. Karst.: дис. на стиск. науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.24. — Москва, 2007. — 26 с.
11. Андрієвський О.М. Фізико-хімічні методи дослідження білків. Посібник для студентів, аспірантів і стажистів, що навчаються на біологічному факультеті. — Одеса, 2003. — 39 с.
12. Кретович В. Л., Метлицкий Л. В., Бокучава М. А. Скобелева Н.И., Кишковский З.Н., Ильин Г.С., Фениксова Р.В. Техническая биохимия. Учебное пособие для студентов университетов и техн.институты пищевой пром-ти. — М.: «Высшая школа», 1973. — 456 с.
13. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. — М.: Изд. МГУ, 1988. — 229 с.
14. Tseng T.G., Lay L.L. Studies of *Ganoderma lucidum*. Dentification of stains by chemical compositions in mycelial extracts // Bot. Bull. Academia Sinica. — 1988. — № 29. — P. 189–199.

Стаття надійшла до редакції 30.07.2012 р.

С.Л. Мирсь, Ю.Ю. Дуденко, Н.С. Бобрешова, Т.В. Гудзенко, В.А. Иваниця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: kaigen@onu.edu.ua

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ СПЕКТРЫ КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗ *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P. KARST В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ И СУБСТРАТА ВЫРАЩИВАНИЯ

Реферат

При помощи метода электрофоретического разделения в полиакриламидном геле были исследованы спектры множественных молекулярных форм карбоксилэстераз мицелия *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, выращенного на средах с овсом и ячменем. Установлено влияние состава и рН экстрагента на выявляемость изоформ фермента. В зависимости от состава питательной среды и условий экстрагирования фермента на электрофореграммах насчитывалось от 2 до 9 изоформ. Константными множественными молекулярными формами карбоксилэстераз, которые определялись во всех вариантах были две среднеподвижные формы с Rf 0,380 и 0,510.

Ключевые слова: *Ganoderma lucidum*, изоформы карбоксилэстераз, изменчивость.



S. Miros, Yu. Dudenko, N. Bobreshova, T. Gudzenko, V. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082,
Ukraine, e-mail: kaigen@onu.edu.ua

**ELECTROPHORETIC SPECTRA OF CARBOXYLESTERASES
ISOFORMS OF *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P.
KARST DEPENDING ON THE EXTRACTION CONDITIONS
AND THE COMPOSITION OF GROWING SUBSTRATE**

Summary

There were investigated the spectra of carboxylesterases isoforms of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst fruit bodies and cultivation mycelium from the substrates composition with oats and barley using the method of alkaline preliminary electrophoretic differentiation in polyacrylamide gel. The effect of pH of extractant in the expressive forms of the enzyme have been determined. Depending on the version of the experiment on electrophoregramme numbered from 2 to 9 isoforms. Const forms, which were determined in all the variants were two forms with Rf 0,380 and 0,510.

Key words: *Ganoderma lucidum*, isoforms of carboxylesterases, variability.

