

УДК: 557.152.31:635.8

МОЛЕКУЛЯРНІ ФОРМИ КАРБОКСИЕСТЕРАЗ ТРУТОВИКА ЛАКОВАНОВОГО (*GANODERMA LUCIDUM*(Curtis) P. Karst.)

С.Л. Міресь, А.М. Андрієвський
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

*Методом лужного електрофсезу в поліакриламідному гелі аналізували екстракти тканин плодового тіла трутовика лакованого *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., що містять ферменти. Молекулярні форми карбоксиестераз визначали шляхом проведення реакції одночасного азосполучення нафтолових продуктів гідролізу α -нафтилацетату, β -нафтилацетату та α -нафтилпропіонату з діазонієм – синім міцним. Знайдені оптимальні умови екстракції карбоксиестераз гриба, що потребують використання лужного буферу з доданням тритону X-100. Визначена група естераз, що найбільш активно гідролізують нафтилацетати та мають середню електрофсретичну рухливість. Обговорюється питання поліморфізму карбоксиестераз у трутовика лакованого.*

Вступ. Трутовик лакований біля 2 тисяч років використовується як лікарняний засіб широкого спектру дії [3, 8]. В дійсний час ця грибна культура активно вирощується у штучних умовах для лікарняної промисловості [3]. У виробництві застосовуються різні штами і постійно селектуються нові. Але й досі залишається невирішеною проблема надійної генетичної ідентифікації отриманих штамів та їх походження. Достатньо інформативним і таким, що легко виконується, є метод електрофоретичного аналізу ферментів [1, 2, 6].

З великої чисельності ферментативних систем для вирішення подібних за-

дач може бути використана високо презентативна система карбоксиестераз, що забезпечує, як трофічну, так і захисну функції організму гриба. На жаль, в науковій літературі практично відсутні дані стосовно поліморфізму карбоксиестераз у грибів. В зв'язку з цим, дана робота мала ціллю оптимізувати умови екстракції та виявлення множинних молекулярних форм карбоксиестераз різних частин плодового тіла трутовика лакованого, а також отримати первинні дані, які б мали характеризувати досліджувані нами ферменти.

Матеріали та методи. В експерименті використовували плодові тіла трутовика лакованого (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.) [11], отриманого з місцевого ізоляту та культивованого на суміші опилу деревини з лушпинням насіння соняшнику у співвідношенні 1 : 1. Плодоношення проходило при температурі 16 °С та вологості повітря 90 %. Проби для отримання екстрактів брали на 12 добу розвитку після утворення примордію з різних частин гриба: краю шляпки, контексту та гіменофору. Наважка кожної проби складала 100 мг. Для пошуку найбільш оптимальних умов екстракції готували декілька водних розчинників на основі гліцину з різними значеннями рН (табл. 1).

Таблиця 1. Екстрагенти, що застосовувались в експерименті

№ п/п	Розчинник	рН
1	Гліцин, 0,1 М	4,0
2	Трис-гліциновий буфер, 0,1 М	7,4
3	Гліцин-NaOH буфер, 0,1 М	9,0
4	Гліцин-NaOH буфер, 0,1 М, з доданням 1 % тритону X-100	9,0

Виділені частини гриба гомогенізували на протязі 2 хвилин у середовищі розчинника при співвідношенні 1 : 10, після чого центрифугували на холоді при 10 000 g на протязі 15 хвилин. Свіжевикотвлені екстракти об'ємом 10 мкл змішували з 5 мкл 0,01 % розчину бромфенілового синього на 60 % сахарозі, потім проводили лужний електрофорез у 10 % поліакриламідному гелі. Після чого відмиті гелеві блоки інкубували в 0,1 М трис-гліциновому буфері рН 7,4, що містив діазоній та субстрати, взяті у кількості 12 мг при сумісному використанні α - і β -нафтилацетатів та 25 мг при використанні α -нафтилпропіонату. Кількість синього міцного у всіх випадках складала 25 мг в розрахунку на 25 мл інкубаційної суміші. Через 20 хвилин інкубації ферментативний процес зупиняли обробкою гелів киплячою дистильованою водою. Потім гелеві блоки відмивали, сканували та аналізували за допомогою спеціальної ліцензованої комп'ютерної програми «АнаИС», яка дозволяє проводити якісну та кількісну оцінку інтенсивності забарвлення виявлених зон локалізації карбоксиестераз. Визначали коефіцієнт Rf та рівень ферментативної активності, яку виражали у відносних одиницях оптичної щільності – ΔDo – забарвлених кінцевим продуктом реакції ферментативних зон. Статистичну обробку первинних даних проводили за визначенням критерію Стьюдента [9].

В роботі використовували реактиви фірм “Reanal” (Угорщина), “Chemapol” (Чехія), “Ferak” (Німеччина), а також установку для вертикально-пластинчастого електрофорезу марки “VE-4” російського виробництва.

Результати і обговорення. Особливістю прояву активності карбоксиестераз в інкубаційному середовищі з двома субстратами є те, що одні форми цих ферментів переважно розщеплюють α -нафтилацетат, тоді як інші – β -нафтилацетат (рис. 1).

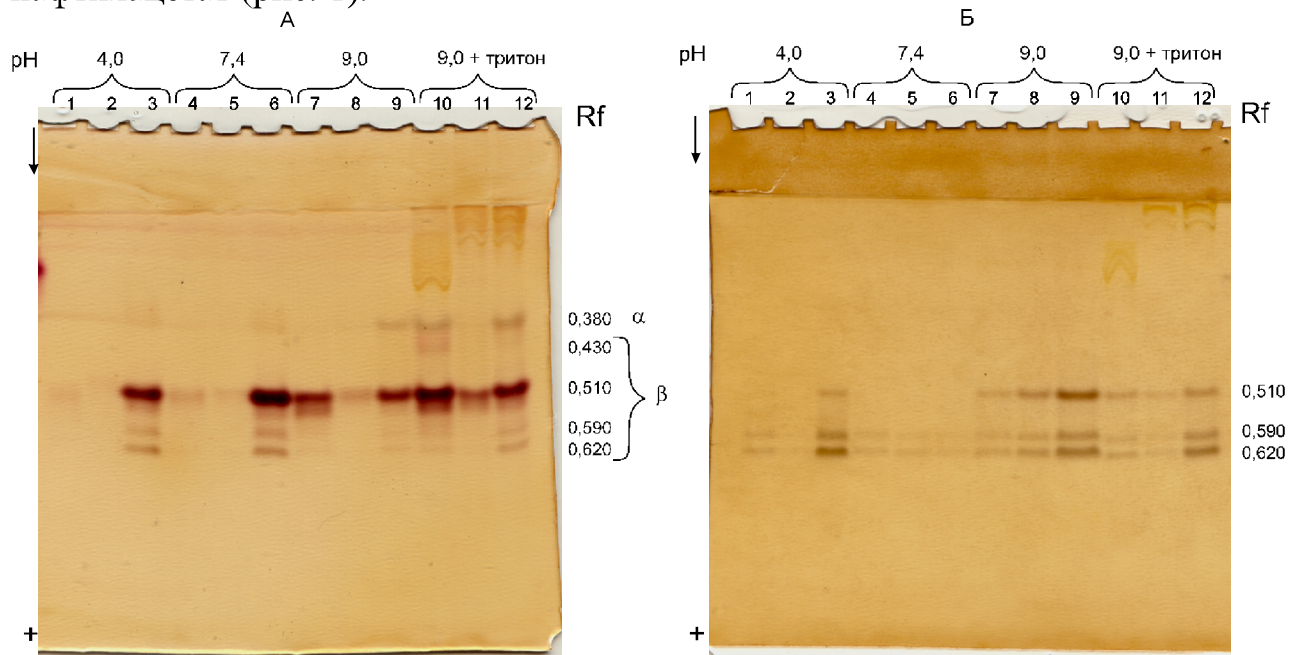


Рис. 1. Молекулярні форми карбоксиестераз трutowика лакованого: А – субстрати: α -нафтилацетат + β -нафтилацетат; Б – субстрат: α -нафтилпропіонат. Електрофореграми: треки: 1, 4, 7, 10 – гіменофор; 2, 5, 8, 11 – контекст; 3, 6, 9, 12 – край. α – карбоксиестерази, що розщеплюють α -нафтилацетат; β – карбоксиестерази, що розщеплюють β -нафтилацетат. Вертикальними стрілками указано напрямок руху ферментів в гелі під час електрофорезу.

Як видно з рисунку 1 (А), спектр кислих карбоксиестераз трutowика містить три основні форми ферментів з Rf 0,510, 0,590 и 0,620, що розщеплюють *in vitro* β -нафтилацетат та одну з Rf 0,380, що розщеплює α -нафтилацетат. Найбільша кількість β -фільних форм міститься в екстрактах з краю плодового тіла при використанні всіх екстрагентів (треки: 3, 6, 9, 12) і гіменофору – при екстракції гліцин-NaOH буфером рН 9,0 (трек 10).

Застосування ефіру пропіонової кислоти и α -нафтолу в якості субстрату (рис. 1, Б) дало можливість виявити ті ж три основні форми естераз з Rf 0,510, 0,590 и 0,620, що відповідають краю плодового тіла трutowика (треки: 3, 6, 9, 12), однак у цьому випадку дві найбільш рухливі форми виявилися більш інтенсивними відносно прояву їх активності до нафтилацетатів. У той же час, основна середньорухлива форма естерази (Rf 0,510) навпаки, значно слабкіше гідролізувала ефір пропіонової кислоти в порівнянні з ефіром оцтової, що вказує на певний рівень субстратної специфічності даного ферменту.

Серед використаних нами екстрагуючих буферних сумішей з різним значенням рН найбільш ефективним виявився 0,1 М гліцин-NaOH буфер рН 9,0. Однак додання в екстрагент тритону Х-100 дозволило виявити ще декілька повільнорухливих мінорних фракцій (Rf 0,150 – 0,260), що говорить про досить міцний зв'язок деяких естераз з мембранними структурами клітин трutowика.

Для виявлення нафтилпропіонатазної активності менш ефективним виявився екстрагент з рН 7,4 (0,1 М тріс-гліциновий буфер). В цьому разі спостерігалось мінімальне забарвлення смуг, що очевидно пов'язано з недостатньою екстракцією відповідних естераз. Разом з тим, при екстракції нейтральним буфером досягається самий високий вихід β -естерази, про що говорить результат виявлення цього ферменту по β -нафтилацетату.

Таким чином, в ході лужного електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі вдалося розподілити основні форми карбоксиестераз трутовика лакованого. При цьому їх електрофоретичні коефіцієнти гарно розрізняються та являють собою досить стабільні показники для кожної окремої фракції ферменту (табл. 2).

Таблиця 2. Залежність прояву активності молекулярних форм карбоксиестераз трутовика лакованого від умов екстракції та інкубації

Множинні молекулярні форми естераз	Rf	рН 4,0			рН 7,4			рН 9,0			рН 9,0 + тритон		
		Гм.	Кт.	Кр.	Гм.	Кт.	Кр.	Гм.	Кт.	Кр.	Гм.	Кт.	Кр.
1 (А)	0,620	–	–	0,348 ± 0,025	–	–	0,386 ± 0,018	–	–	0,256 ± 0,021	0,275 ± 0,017	–	0,301 ± 0,021
1 (Б)		0,274* ± 0,016	0,187* ± 0,005	0,553 ± 0,028	0,194 ± 0,010	0,192 ± 0,021	0,167 ± 0,007	0,219* ± 0,021	0,187* ± 0,007	0,429 ± 0,023	0,198* ± 0,005	0,217* ± 0,019	0,418 ± 0,024
2 (А)	0,590	–	–	0,302 ± 0,021	–	–	0,351 ± 0,017	–	–	0,260 ± 0,022	0,288* ± 0,021	–	0,383 ± 0,019
2 (Б)		0,237 ± 0,022	0,194* ± 0,011	0,378 ± 0,018	0,189 ± 0,010	0,154 ± 0,007	0,172 ± 0,014	0,219* ± 0,012	0,166* ± 0,009	0,327 ± 0,019	0,248 ± 0,021	0,198* ± 0,015	0,303 ± 0,023
3 (А)	0,510	0,264* ± 0,019	0,239* ± 0,017	1,060 ± 0,058	0,311* ± 0,025	0,281* ± 0,022	2,100 ± 0,087	0,868 ± 0,044	0,360* ± 0,022	0,932 ± 0,043	1,710* ± 0,076	0,625* ± 0,038	1,230 ± 0,057
3 (Б)		–	–	0,286 ± 0,024	–	–	–	0,230* ± 0,020	0,168* ± 0,018	0,615 ± 0,038	0,155* ± 0,007	0,248* ± 0,019	0,307 ± 0,015
4 (А)	0,430	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,307* ± 0,034	–	–
4 (Б)		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5 (А)	0,380	0,235 ± 0,017	–	0,247 ± 0,014	0,239 ± 0,012	–	0,230 ± 0,018	0,237 ± 0,013	–	0,303 ± 0,021	0,328 ± 0,024	0,253* ± 0,017	0,375 ± 0,009
5 (Б)		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примітка: дані ($M \pm m$ при $n = 3$) відображують відносні одиниці оптичної щільності (ΔDo) відповідних фракцій гелевого блоку, що містять ферменти. Гм. – гіменофор; Кт. – контекст; Кр. – край шляпки. У дужках: А – гідроліз нафтилацетатів, Б – гідроліз нафтилпропіонату. «–» – відсутність ферментативної активності. * – відмінності між варіантами, що порівнюються вірогідні при $P < 0,05$.

З даних таблиці видно, що найбільша активність серед молекулярних форм, що виявляються по нафтилацетатам (А), притаманна β -специфічній формі 3 (А) з коефіцієнтом відносної рухливості 0,510, яка виявляється у всіх пробах. Ця ж форма може гідролізувати і α -нафтилпропіонат, але із значно меншою активністю, яка не спостерігається при екстракції нейтральним буфером з усіх досліджуваних частин гриба і буфером з рН 4,0 з гіменофору та контексту. Менш активними є форми 1 і 2 з Rf 0,620 та 0,590 відповідно. Ці форми також можуть гідролізувати як α -нафтилацетат, так і β -нафтилацетат. В першому випадку вони виявляються у всіх пробах, а в другому – тільки в пробах, що були взяті з краю плодового тіла при екстракції будь-яким з буферів, а також з гіменофору при використанні екстрагенту з тритоном.

Крім зазначених трьох молекулярних форм карбоксиестераз, при використанні нафтилацетатів виявляються дві додаткові форми з середньою активністю, які відсутні на гелях після інкубації з нафтилпропіонатом. Форма 4 (А) з R_f 0,430 та оптичною щільністю 0,307 виявляється тільки в пробі, що була отримана з гіменофору у разі екстракції в лужному середовищі з використанням тритону. Форма 5 (А) з R_f 0,380, що розщеплює α -нафтилацетат, виявляється в пробах, взятих з гіменофору та краю плодового тіла, з відносною активністю в межах 0,230 – 0,375 одиниці. Додання до лужного буферу тритону під час екстракції дозволило виявити цю форму і в контексті плодового тіла.

Чи є виділені нами форми карбоксиестераз аллозимами або ізозимами поки що невідомо, тому що екземпляри трутовика, що були проаналізовані, мали один генотип. Для встановлення генетичної детермінації виявлених форм карбоксиестераз необхідно провести порівняння спектрів молекулярних форм досліджуваних ферментів у представників різних генотипових класів.

Висновки

Таким чином, в проаналізованих нами пробах трутовика лакованого спостерігалось варіювання як кількості молекулярних форм карбоксиестераз, так і ферментативної активності деяких з них. Для порівняння активності окремих форм ферментів у різних частинах гриба в якості контрольних варіантів були прийняті молекулярні форми естераз, отримані з краю шляпки гриба (в таблиці показано жирним шрифтом). Дані варіанти нараховували найбільшу кількість смуг з найвищою активністю ферменту, за виключенням деяких форм, що, вірогідно, не відрізнялись від аналогічних фракцій з інших частин плодового тіла. Для варіанту з доданням тритону Х-100 максимальну кількість отриманих молекулярних форм карбоксиестераз було знайдено у гіменофорі, але найбільш активними залишилися ті ж ферменти краю плодового тіла. Виявлені нами відмінності можна пов'язати з різними функціями, що виконують дані «тканини» у гриба та відповідно із їх різною будовою. В експериментах, проведених іншими дослідниками на різних плодкових тілах вищих базидіоміцетів, також були виявлені «тканинні» відмінності за вмістом білків, вуглеводних компонентів, меланінів та деяких вітамінів [4, 5].

Література

1. Андрієвський О. М. Фізико-хімічні методи дослідження білків. Посібник для студентів, аспірантів і стажистів, що навчаються на біологічному факультеті. – Одеса, 2003. – 39 с.
2. Андриевский А. М. Термочувствительность молекулярных форм гидролаз эфиров карбоновых кислот личинок, куколок и имаго *Drosophila melanogaster* // Вісник ХНУ. Серія біологія. – 2006. – Вип. 4, № 748. – С. 3 – 11.
3. Бабицкая В. Г., Щерба В. В., Смирнов Д. А., Бисько Н. А. Биологически активные соединения грибов *Inonotus obliquus* и *Ganoderma lucidum*, факторы, влияющие на их образование // Достижения, проблемы и перспективы культивирования грибов. Совр. технологии. – Донецк, 2005. – С. 68 – 70.
4. Ветрова Е. В. Электрофоретические исследования легкорастворимых белков плодовых тел некоторых базидиомицетов // Достижения, проблемы и перспективы культивирования грибов. Совр. технологии. – Донецк, 2005. – С. 75 – 78.
5. Дерев'янюк Я. Ю., Ветрова Е. В. Вміст меланінів в різних ділянках плодкових тіл

- деяких базидіоміцетів // Достижения, проблемы и перспективы культивирования грибов. Совр. технологии. – Донецк, 2005. – С. 100 – 102.
6. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. – М.: Наука, 1977. – 278 с.
 7. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973–320 с.
 8. Lindequist U., Niedermeyer T. H. J., Julich W. D. The pharmacological potential of mushrooms // eSAM, 2005. – № 2 (3). – P. 285 – 299.
 9. Pöder R. Stchworte zur systematic der mikroorganismen. – Version 4, 2003. – 135 p.

*Методом щелочного электрофреза в полиакриламидном геле анализировали ферментсодержащие экстракты тканей плодового тела трутовика лакированного (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.). Молекулярные формы карбоксиэстераз выявляли путём проведения реакции одновременного азосочетания нафтоловых продуктов гидролиза α -нафтилацетата, β -нафтилацетата и α -нафтилпропионата с диазонием – синим прочным. Найдены оптимальные условия экстракции карбоксиэстераз исследуемого гриба, предусматривающие использование щелочного буфера с добавкой тритона X-100. Обнаружена группа эстераз, наиболее активно гидролизующих нафтилацетаты и обладающих средней электрофоретической подвижностью. Обсуждается вопрос полиморфизма карбоксиэстераз у трутовика лакированного.*

*The extracts of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. fruit body tissues were analyzed by the method of the alkaline preliminary electrophoretically in the polyacrylamide gel. Molecular forms of the carboxylesterases were investigated by synchronous diazo reaction with naphthol product of hydrolysis α -naphthylacetate, β -naphthylacetate and α -naphthylpropionat with diazonium. As a result the optimum conditions of the mushroom ferments extraction were founded. It is the alkaline buffer with adding triton X-100. The group of esterases, which are the most active hydrolyze naphthylacetates and have the medium electrophoretically mobility has been founded. We discuss the problem of the carboxylesterases polymorphism of *Ganoderma*.*