

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ВОДО- И ЩЕЛОЧЕРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ НЕКОТОРЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ (Basidiomycota)

Исполнитель:

Студент 2-го курса магистратуры
кафедры микологии и альгологии
Б.Р.Джавахан

Научный руководитель:

д.б.н. Л.М.Краснопольская
д.б.н., профессор Л.В.Гарибова

Окислительный стресс играет важную роль в патогенезе целого ряда социально-значимых заболеваний, таких как **атеросклероз, сахарный диабет, онкологические заболевания**. Доказана роль свободных радикалов в возникновении и протекании заболеваний, связанных с нарушением мозгового, коронарного или периферического кровообращения, диабетической ангиопатии, ревматоидных, воспалительных и дегенеративных заболеваний опорно-двигательной системы, болезней Альцгеймера и Паркинсона и др.

Актуальность работы заключается в поиске новых антиоксидантов и выявлении антиоксидантных свойств у веществ, обладающих иной биологической активностью.

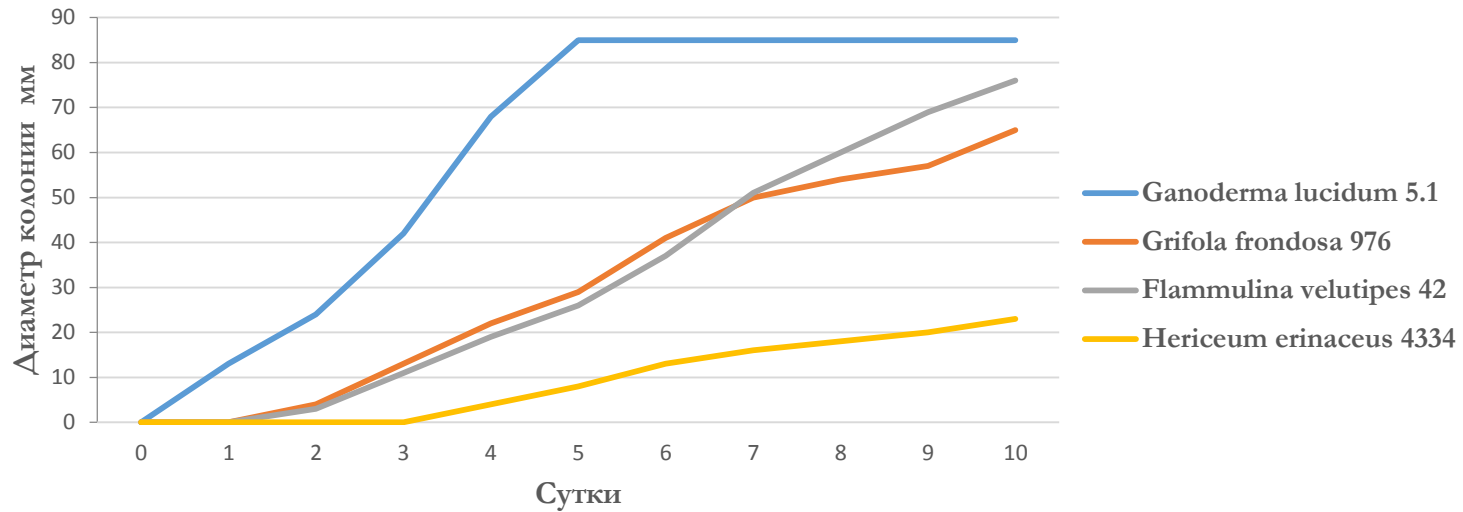
Цель: изучение **антиоксидантных свойств** противоопухолевых водо- и щелочерастворимых полисахаридов из *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Flammulina velutipes* и *Hericium erinaceus*

Задачи:

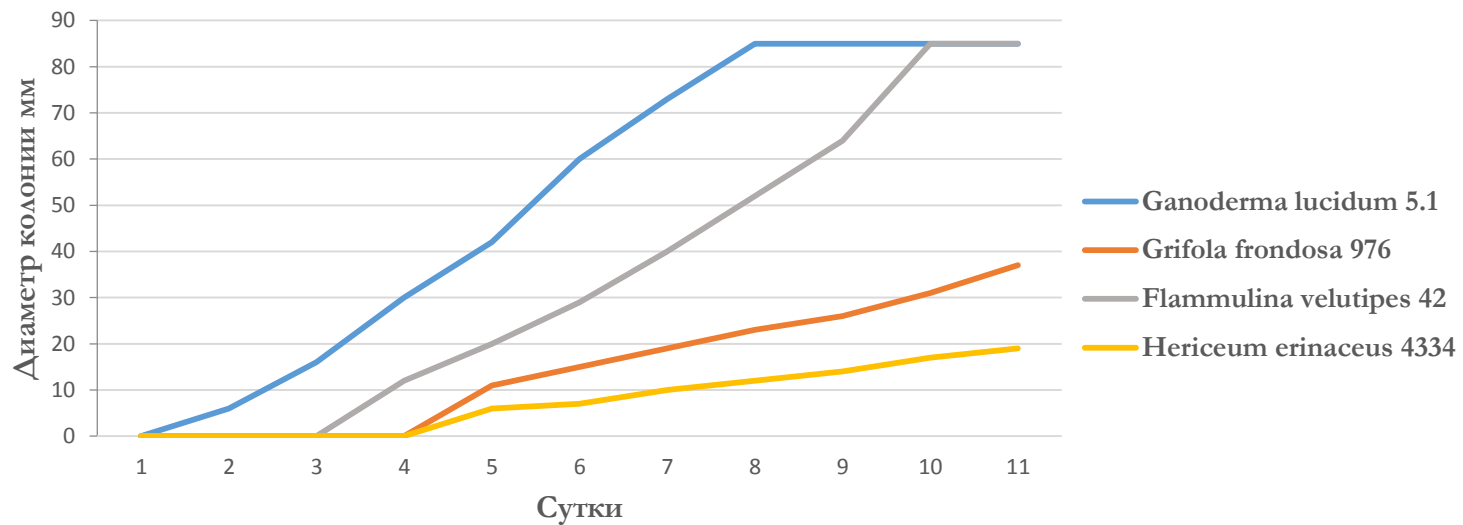
- Изучение **морфолого-культуральных особенностей** исследуемых видов при росте на плотных питательных средах и в погруженной культуре
- **Получение водорастворимых полисахаридов** *G.lucidum*, *G.frondosa*, *F.velutipes* и *H.erinaceus* и **щелочерастворимых полисахаридов** *G.lucidum*
- **Биохимическое изучение** суммарных фракций водорастворимых полисахаридов
- Изучение **антиоксидантных свойств** полученных препаратов полисахаридов **кулонометрическим методом, методом хелатирования ионов Fe^{2+} и методом определения антирадикальной активности по отношению к 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил - радикалу (ДФПГ)**

Скорость роста мицелия на плотной питательной среде

Скорость роста на плотной питательной среде СА



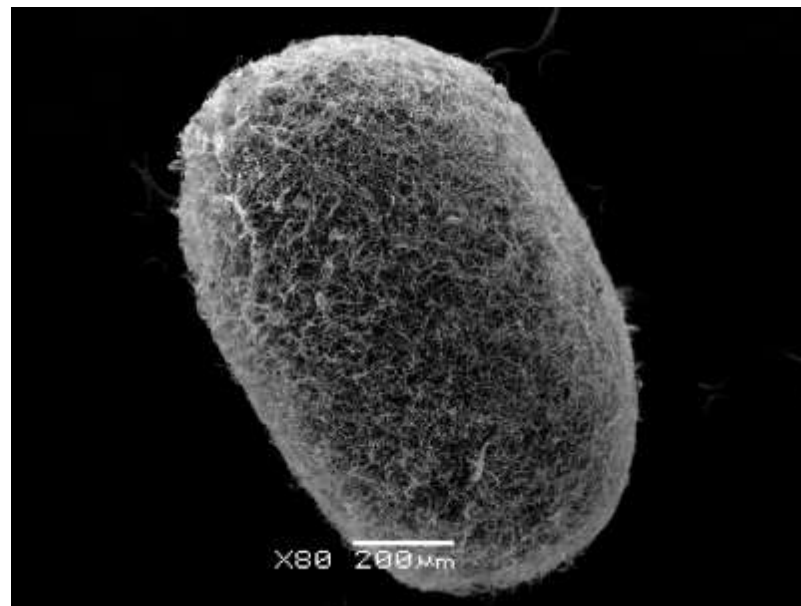
Скорость роста на плотной питательной среде КГА



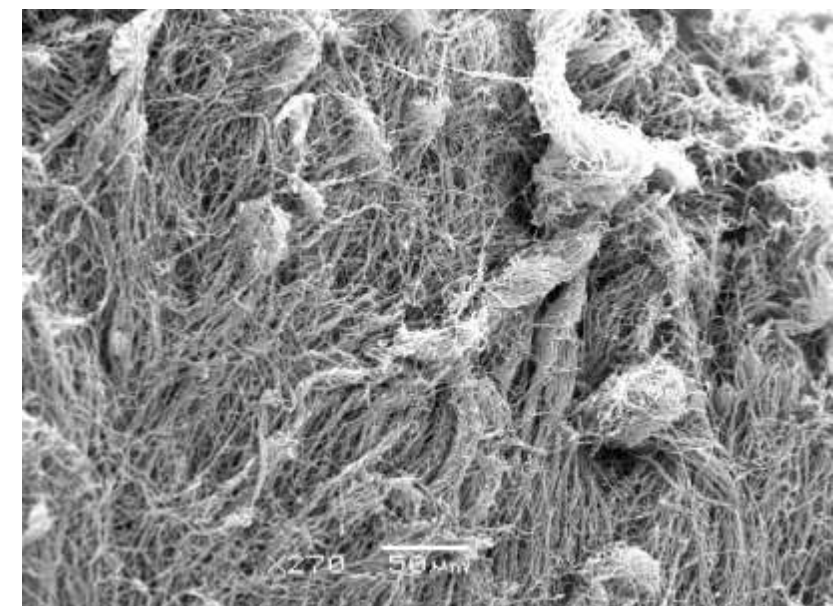
Микроморфология погруженного мицелия



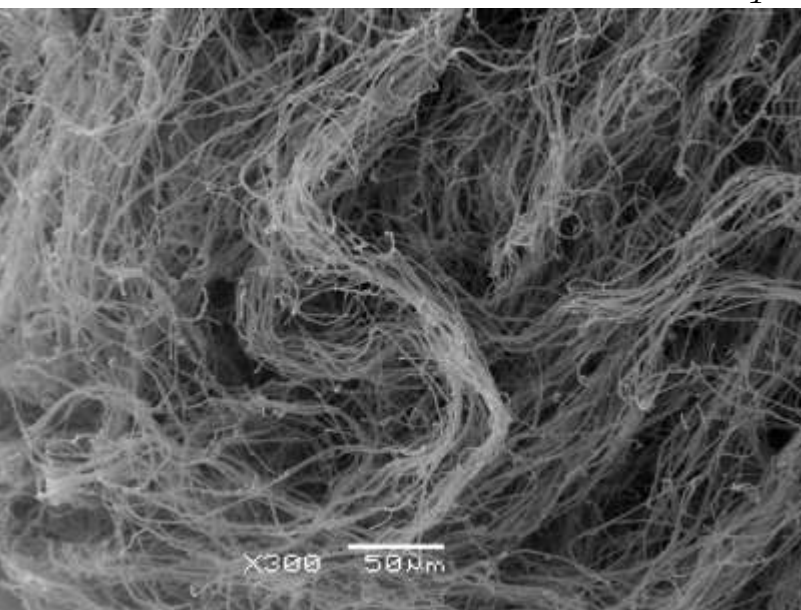
Внешний вид пеллеты *Flammulina velutipes* 42



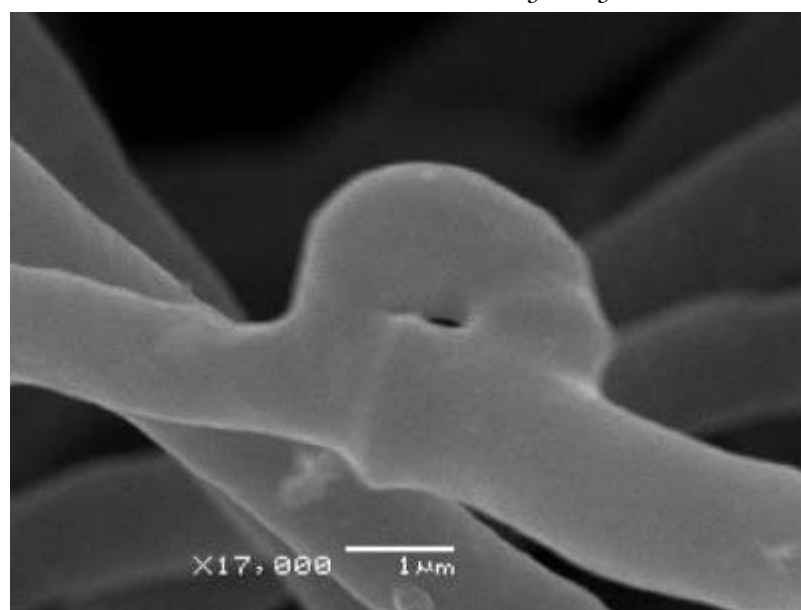
Внешний вид пеллеты *Grifola frondosa* 976



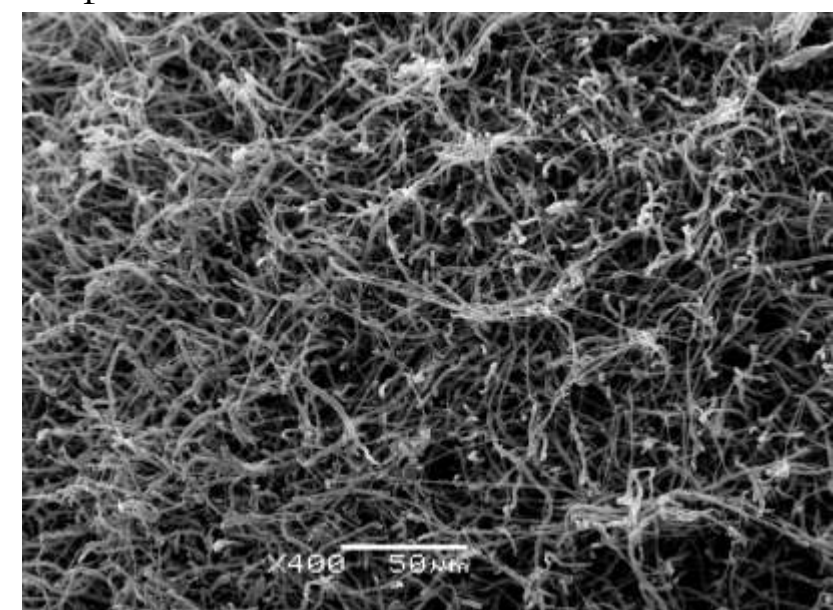
Поверхность пеллеты *Ganoderma lucidum* 5.1



Поверхность пеллеты *Hericium erinaceus* 4334

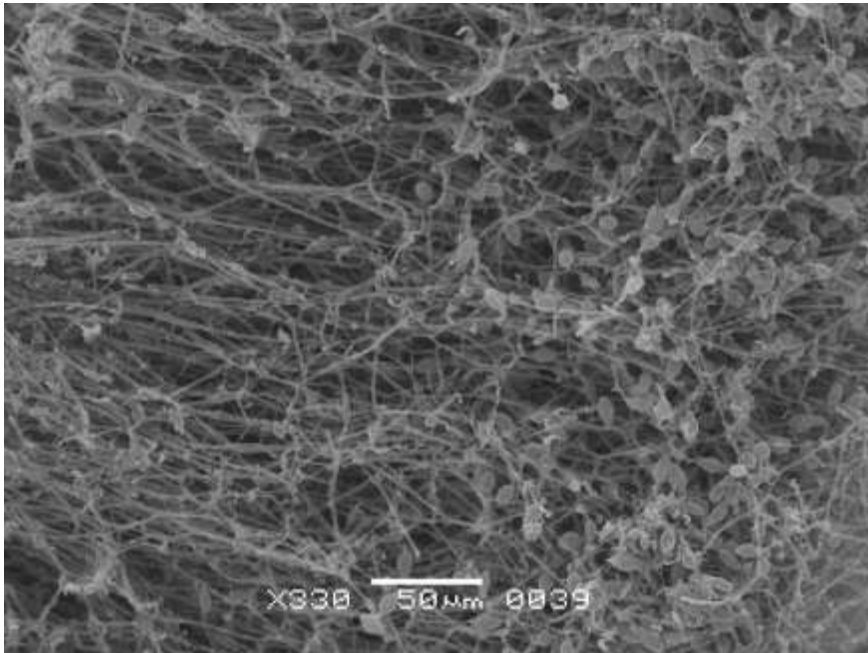


Пряжка *Hericium erinaceus* 4334

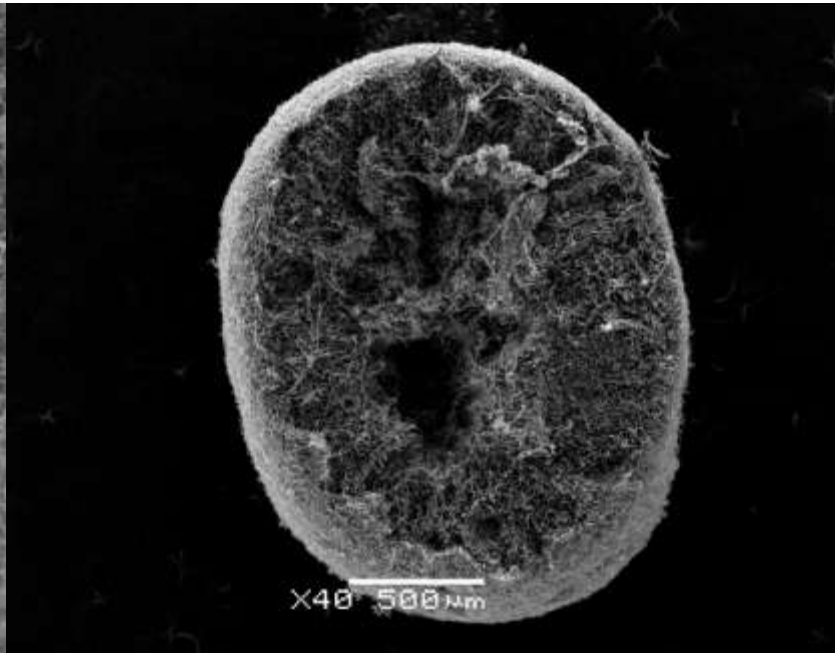


Поверхность пеллеты *Grifola frondosa* 976

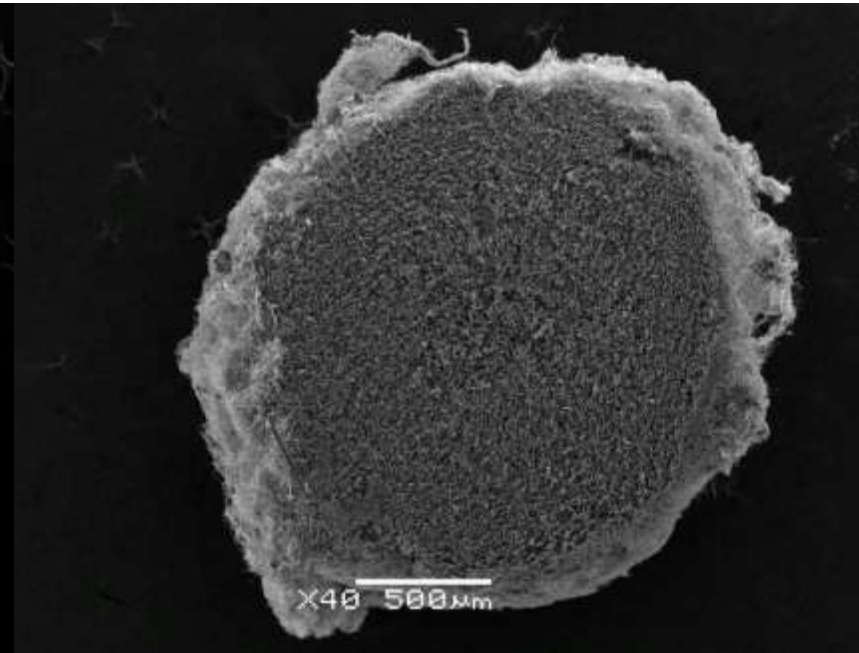
Микроморфология погруженного мицелия



Срез пеллеты *Ganoderma lucidum* 5.1

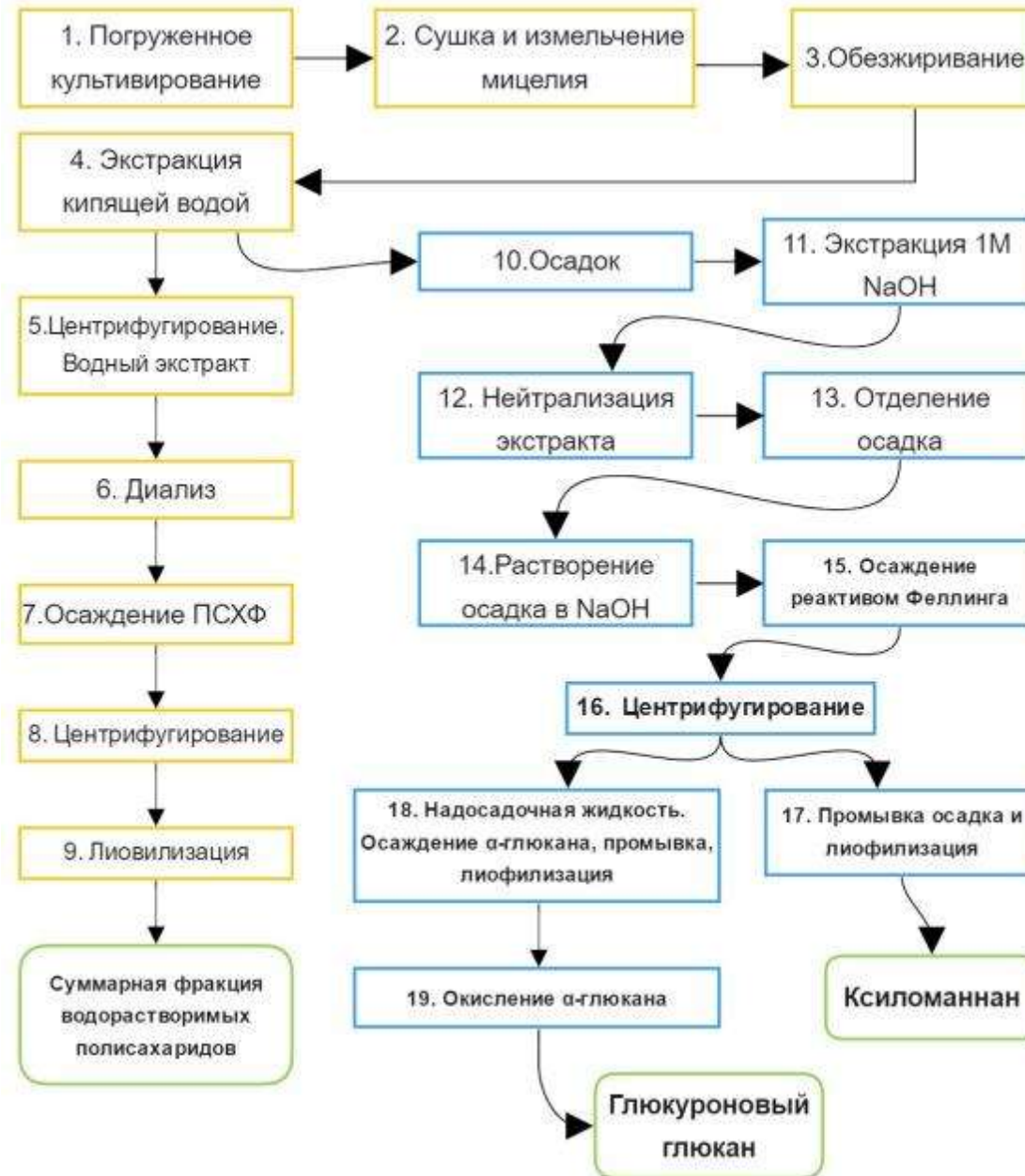


Срез пеллеты *Grifola frondosa* 976



Срез пеллеты *Flammulina velutipes* 42

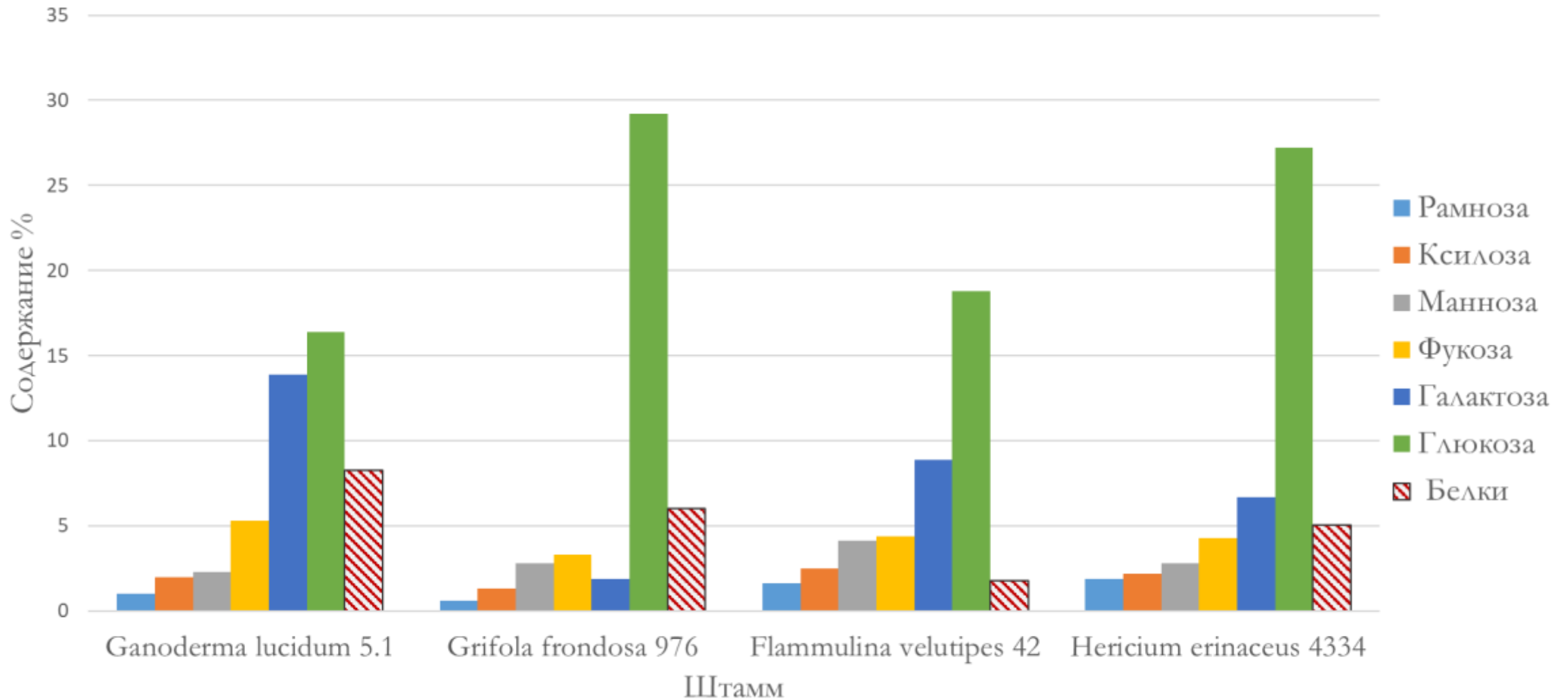
Схема выделения полисахаридов



Содержание и выход суммарных фракций водорастворимых полисахаридов

Вид	Масса воздушно-сухого мицелия, г/л	Содержание водорастворимы х полисахаридов в биомассе, %	Выход водорастворимых полисахаридов, г/л
<i>Ganoderma lucidum</i> 5.1 (мицелий)	16,92±0,13	1,29	2,2
<i>Gridola frondosa</i> 976 (мицелий)	10,82±0,08	1,05	1,1
<i>Flammulina velutipes</i> 42 (мицелий)	24,07±0,42	1,75	4,2
<i>Hericiium erinaceus</i> 4334 (мицелий)	16,30±0,03	1,88	3,1
<i>Hericiium erinaceus</i> (пл. тела) 4334	-	4,19	-

Содержание нейтральных моносахаридов и белков в суммарных фракциях водорастворимых полисахаридов



Измерение общей антиоксидантной емкости полисахаридов грибов кулонометрическим методом

Штамм	АОЕ в мг аск. к-ты на 100мг вещества
<i>Ganoderma lucidum</i> 5.1 (мицелий)	0,11±0,01
<i>Grifola frondosa</i> 976 (мицелий)	0,1±0,01
<i>Flammulina velutipes</i> 42 (мицелий)	0,53±0,31
<i>Hericium erinaceus</i> 4334 (мицелий)	0,92±0,14
<i>Hericium erinaceus</i> 4334 (Пл.тела)	2,24±0,15
Индивидуальные соединения	
GGA*	0,85±0,05
Ксиломаннан	0,08±0,01

GGA* - Глюкуроновый
глюкан

АОЕ водного экстракта свежих плодов боярышника зеленомякотного (*Crataegus chlorosarca*) -2,1±0,18

Измерение способности полисахаридов к хелатированию ионов Fe^{2+}

Штаммы	EC50
<i>Ganoderma lucidum</i> 5.1 (мицелий)	1,17±0,03
<i>Grifola frondosa</i> 976 (мицелий)	15,71±1,83
<i>Flammulina velutipes</i> 42 (мицелий)	2,33±0,11
<i>Hericiium erinaceus</i> 4334 (мицелий)	9,83±0,01
<i>Hericiium erinaceus</i> 4334 (пл. тела)	4,6±0,33
Индивидуальный полисахарид	
GGA	19,73±2,28
Ксиломаннан	*
Позитивный контроль	
EDTA	2,09±0.09

* - полученные в условиях эксперимента результаты не позволяют рассчитать EC50.

Ряд штаммов по уменьшению хелатирующей активности:
GL 5.1>FV 42>HE 4334>GF 976

Ряд штаммов по уменьшению содержания остатков галактозы:
GL 5.1>FV 42>HE 4334>GF 976

Антирадикальная активность полисахаридов по отношению к ДФПГ

Штаммы	EC50	
	Водорастворимые полисахариды	Этанольные экстракты
<i>Ganoderma lucidum</i> 5.1 (мицелий)	0	1,15±0,05
<i>Grifola frondosa</i> 976 (мицелий)	0	0,49±0,03
<i>Flammulina velutipes</i> 42 (мицелий)	0	1,64±0,05
<i>Hericiium erinaceus</i> 4334 (мицелий)	0	0,65±0,01
<i>Hericiium erinaceus</i> 4334 (пл.тела)	0	0,18±0,04
Индивидуальный полисахарид		
GGA	0	
Ксиломаннан	0	

Выводы

1. Наибольшую **скорость линейного роста** на СА и КГА показал штамм ***G.lucidum* 5.1**, а наименьшую — штамм *H.erinaceus* 4334.

КГА обеспечивал более высокую скорость роста всех изученных штаммов по сравнению с СА. При погруженном культивировании все штаммы образовывали **шарообразные или геоидные пеллеты**: с гладкой поверхностью у *G.froncosa* 976, с **тяжами или пучками** гиф на поверхности у *G.lucidum* 5.1 и *H.erinaceus* 4334, соответственно, с **длинными отростками** у *F.velutipes* 42. Поверхность пеллет *G.froncosa* 976 представляла собой **сетчатую структуру**, вероятно, обеспечивающую их **упругость и постоянство формы**. У *G.lucidum* 5.1, *G.froncosa* 976, *H.erinaceus* 4334 пеллеты были с полостью, у *F.velutipes* пеллеты были полностью **заполнены гифами**, что объясняет более **высокий выход биомассы** этого штамма в сравнении с остальными. Пеллеты *G.lucidum* 5.1 отличались внутренней организацией, представленной **слоистой структурой**. Все изученные штаммы в погруженной культуре образовывали **пряжки**.

2. Были **получены суммарные фракции водорастворимых полисахаридов** погруженного мицелия *G.lucidum* 5.1, *G.froncosa* 976, *F.velutipes* 42, *H.erinaceus* 4334 и пл тел *H.erinaceus* 4334, а также препараты щелочерастворимых полисахаридов: **ксиломаннана и α -глюкана** из погруженного мицелия *G.lucidum* 5.1. Наибольший выход водорастворимых полисахаридов обеспечивал погруженный мицелий *F.velutipes* 42, что связано с интенсивным накоплением погруженной биомассы. Полученный препарат **α -глюкана** был передан в ИОХ РАН для химической модификации, полученный в результате глюкуроновый глюкан **GGA** был включен в программу изучения антиоксидантной активности.

3. Водорастворимые полисахариды всех изученных штаммов включали остатки 6 нейтральных **моносахаридов**: рамнозы, ксилозы, маннозы, фукозы, галактозы и глюкозы. У *G.lucidum* 5.1, *F.velutipes* 42, *H.erinaceus* 4334 преобладали остатки **глюкозы и галактозы**, у *G.froncosa* 976 – глюкозы. Суммарные фракции водорастворимых полисахаридов изученных штаммов содержали от **1,80 до 8,25 % белков**. Максимальное содержание белка было отмечено у *G.lucidum* 5.1, минимальное – *F.velutipes* 42.

4. Изучение антиоксидантных свойств кулонометрическим методом показало, что среди водорастворимых полисахаридов, выделенных из мицелия изученных штаммов **наибольшей активностью обладал препарат из *H.erinaceus* 4334**. Близкое значение **АОЕ** было у индивидуального полисахарида **GGA**. Наименьшая активность отмечена у *G. lucidum* 5.1, *G. frondosa* 976 и у индивидуального полисахарида ксиломаннан. **Максимальную АОЕ** в этом опыте показали водорастворимые **полисахариды**, выделенные из **плодовых тел *H.erinaceus* 4334**.

5. Наиболее выраженной **хелатирующей способностью** среди водорастворимых полисахаридов из мицелия обладали ***G. lucidum* 5.1 и *F.velutipes* 42**, что может быть связано с высоким содержанием в них остатков галактозы. GGA показал низкую способность к связыванию ионов Fe^{2+} , у ксиломаннана хелатирующая способность обнаружена не была.

6. Все изученные полисахаридные препараты **не проявили антирадикальной** активности в отношении **ДФПГ**

Выражаю благодарность

Краснопольской Л.М.,

Гарибовой Л.В.,

Яриной М.С.,

Альмяшевой Н.Р.

Гольшкину А.В

Громовых Т.И.,

Завьяловой Л.А.

Спасибо за внимание

Использованные методы

- Культивирование на **плотной питательной среде** и в **погруженной культуре**
- Получение **плодовых тел** по стандартной методике (Бухало и др., 2004)
- **Выделение препаратов полисахаридов**
- **Определение содержания и выхода фракций водорастворимых полисахаридов**
- **Количественное определение белка** в суммарных фракциях водорастворимых полисахаридов (Bradford, 1976).
- Измерение общей антиоксидантной емкости (АОЕ) полисахаридов и этанольных экстрактов грибов методом **кулонометрического титрования** (Лапин и др., 2009)
- Измерение способности полисахаридов к **хелатированию ионов Fe^{2+}** (Dinis et al., 1994).
- Измерение **антирадикальной активности** полисахаридов по отношению к ДФПГ (Blois, 1958).
- Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

