

СТИМУЛИРОВАНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ БАЗИДИОМИЦЕТА *MYCENA GOMBAKENSIS* СОКОМ АНАНАСА

Научная статья

Пузырь А.¹, Посохина Е.Д.², Буров А.^{3,*}²ORCID : 0000-0002-8276-9213;³ORCID : 0000-0002-4360-0335;^{1,2} Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Российская Федерация³ Федеральное исследовательское учреждение информационных и вычислительных технологий, Красноярск, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (aeburov[at]ict.nsc.ru)

Аннотация

Недавнее открытие механизма биolumинесценции высших грибов открывает новые возможности для широкого ряда биотехнологических применений. Поиск и исследование действия стимуляторов люминесцентной реакции является актуальной задачей, решение которой расширяет представления о биolumинесцентном потенциале базидиомицетов. Работа посвящена изучению действия сока ананаса на люминесценцию светящегося базидиомицета *Mycena gombakensis*, биомассу которого получали методом глубинного и поверхностного культивирования мицелия. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют, что сок ананаса не содержит компоненты биolumинесцентной реакции. Однако его добавление в несколько раз увеличивает интенсивность люминесценции *in vivo* пеллет *M. gombakensis* и выделенных из них ферментных систем *in vitro*.

Ключевые слова: биolumинесценция, светящиеся базидиомицеты, *Mycena gombakensis*, ферментная система, стимулятор.

STIMULATION OF THE LUMINESCENT RESPONSE OF THE BASIDIOMYCETE *MYCENA GOMBAKENSIS* BY PINEAPPLE JUICE

Research article

Puzyr A.¹, Posokhina E.D.², Burov A.^{3,*}²ORCID : 0000-0002-8276-9213;³ORCID : 0000-0002-4360-0335;^{1,2} Institute of Biophysics of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation³ Federal Research Center for Information and Computational Technologies, Krasnoyarsk, Russian Federation

* Corresponding author (aeburov[at]ict.nsc.ru)

Abstract

The recent discovery of the bioluminescence mechanism of higher fungi opens new opportunities for a wide range of biotechnological applications. The search for and study of the action of stimulators of luminescent response is an urgent task, the solution of which expands the ideas about the bioluminescent potential of basidiomycetes. This work is dedicated to the study of the effect of pineapple juice on the luminescence of the luminescent basidiomycete *Mycena gombakensis*, the biomass of which was obtained by deep and surface cultivation of mycelium. The results of experimental studies indicate that pineapple juice does not contain components of the bioluminescent reaction. However, its addition increases the intensity of *in vivo* luminescence of *M. gombakensis* pellets and *in vitro* enzyme systems isolated from them several times.

Keywords: bioluminescence, luminescent basidiomycetes, *Mycena gombakensis*, enzyme system, stimulant.

Введение

Согласно общепринятому представлению, люминесценция базидиомицетов в природе или при культивировании биомассы в лабораторных условиях вызывается ферментной системой [1], [2]. Фермент гиспидин-синтаза преобразует кофейную кислоту в гиспидин. Гиспидин преобразуется ферментом гиспидин-3-гидроксилаза в люциферин, а из люциферина, благодаря ферменту люцифераза, образуется окисленный люциферин и излучаются кванты света. Окисленный люциферин ферментом кофеил пируват гидролаза вновь преобразуется в кофейную кислоту, и цикл излучения повторяется [3], [4].

Ферментные системы светящихся грибов, содержащие компоненты люминесцентной реакции, можно выделить из плодовых тел или культивируемой биомассы базидиомицетов [5], [6]. При этом появляется возможность изучения *in vitro* интенсивности и кинетики люминесценции, которые определяются составом веществ, вносимых в раствор ферментной системы. В биolumинесцентном анализе вносимые вещества вызывают три эффекта:

- 1) ингибирующий, сопровождаемый снижением интенсивности люминесценции;
- 2) нейтральный, когда отсутствуют изменения в интенсивности люминесценции;
- 3) стимулирующий, ведущий к увеличению интенсивности люминесценции.

Под стимулятором мы подразумеваем вещества, не являющиеся компонентами люминесцентной реакции (субстрат ферментной реакции или НАДФН), которые увеличивают квантовый выход ферментной системы и выделяются из нелюминесцентных растительных объектов.

Считается, что светящиеся грибы имеют общий механизм биolumинесценции и содержат гиспидин, являющийся предшественником субстрата люминесцентной системы [5], [7]. Горячие экстракты, полученные из плодовых тел

светящихся и несветящихся грибов или мицелия [8], питательные среды при культивировании биомассы [8] и экстракты некоторых растений [9] не относятся к стимуляторам, так как содержат гиспидин.

Работа посвящена изучению сока ананаса (СА), как стимулятора люминесценции ферментной системы базидиомицета *Mycena gombakensis*. Результаты исследований свидетельствуют, что СА не содержит субстрат люминесцентной реакции и НАДФН, однако стимулирует *in vivo* люминесценцию пеллет *M. gombakensis* и выделенных из них ферментных систем *in vitro*.

Методы и принципы исследования

Ананасы, выращенные в Китае, приобретены в торговой сети города Красноярск. Сок получали путем отжима мякоти плода с помощью механического пресса и последующим центрифугированием 30 мин при 16000g на центрифуге Avanti® J-E (Beckman-Coulter, США). Для увеличения концентрации веществ в образце и сохранности свойств препаратов супернатанты лиофильно высушивали на установке ЛС-500 (Россия), а затем перед измерением разводили в деионизованной воде Milli-Q system (Millipore, США).

В работе использовали люминесцентную культуру базидиомицета *M. gombakensis* (культура 2371) из Коллекции культур Института биофизики СО РАН. Биомассу *M. gombakensis* получали методом глубинного и поверхностного культивирования мицелия используя картофельно-сахарозную питательную среду (200 г/л картофеля, 20 г/л сахарозы). Культуры росли при температуре 27°C при глубинном культивировании с постоянным перемешиванием колб с посевным материалом, а при поверхностном культивировании без перемешивания в чашках Петри. Подробнее методы культивирования описаны в работе [10]. Выросшие мицелиальные пеллеты в форме глобул использовали для проведения экспериментов *in vivo*.

Изучение *in vitro* кинетики реакций на внесение СА проводили на ферментной системе, выделенной из пеллет *M. gombakensis*. Методика выделения ферментной люминесцентной системы подробно описана в работах [10]. Необходимо отметить, что из биомассы мицелия *M. gombakensis* в зависимости от условий культивирования можно получить 2 типа люминесцентных систем. При культивировании в объеме жидкой питательной среды выделенная ферментная система не содержит эндогенный субстрат ферментативной реакции, тогда как при культивировании на поверхности жидкой питательной среды ферментная система содержит эндогенный субстрат. В качестве экзогенного субстрата люминесцентной реакции *in vitro* использовали горячий экстракт из плодовых тел нелюминесцентного гриба *Pholiota squarrosa*, получение которого описано в работе [11]. Лиофильно высушенные образцы ферментных систем и все используемые в экспериментах растворы хранили при температуре -20°C.

Кинетику и интенсивность люминесцентных сигналов в относительных единицах (RLU) регистрировали *in vivo* и *in vitro* с помощью люминометра Glomax 20/20 (Promega BioSystems Sunnyvale, Inc., США) в режиме одно измерение в секунду. Для визуализации люминесценции пеллет применяли гель-документирующую систему GelDoc XR Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Данный прибор позволяет получить изображение образцов при наличии света и зарегистрировать люминесценцию в отсутствии освещения. Получаемое изображение является черно-белым, но программное обеспечение позволяет получить его в цвете. Поскольку большинство грибов имеют максимумы спектров излучения биолюминесценции в диапазоне 520-530 нм [12], изображения люминесцирующих объектов представлены в зеленом цвете.

Основные результаты и обсуждение

Ферментная система *M. gombakensis*, не содержащая эндогенного субстрата. Результаты регистрации люминесценции при разной последовательности добавления веществ в реакционную среду представлены на рис. 1. Во всех случаях добавление только НАДФ к системе 2371 не меняет уровень люминесцентного сигнала. Люминесценция возрастает при последующем добавлении экстракта *P. squarrosa*, содержащего экзогенный субстрат люминесцентной реакции (кривые а и б). Последующее добавление СА приводит к дополнительному увеличению люминесценции (б).

Отсутствие увеличения люминесценции при добавлении НАДФН означает, что ферментная система, выделенная из пеллет, культивируемых в объеме жидкой питательной среды, не имеет эндогенного субстрата. Поэтому изменения в кинетике люминесцентной реакции будут определяться только добавленными к ней веществами.

Добавление НАДФН и СА не меняет люминесцентный отклик ферментной системы (в). Следовательно, СА не является субстратом люминесцентной реакции. Подтверждением того, что ферментная система функционирует, следует из увеличения люминесценции при последующем добавлении экстракта *P. squarrosa* (б).

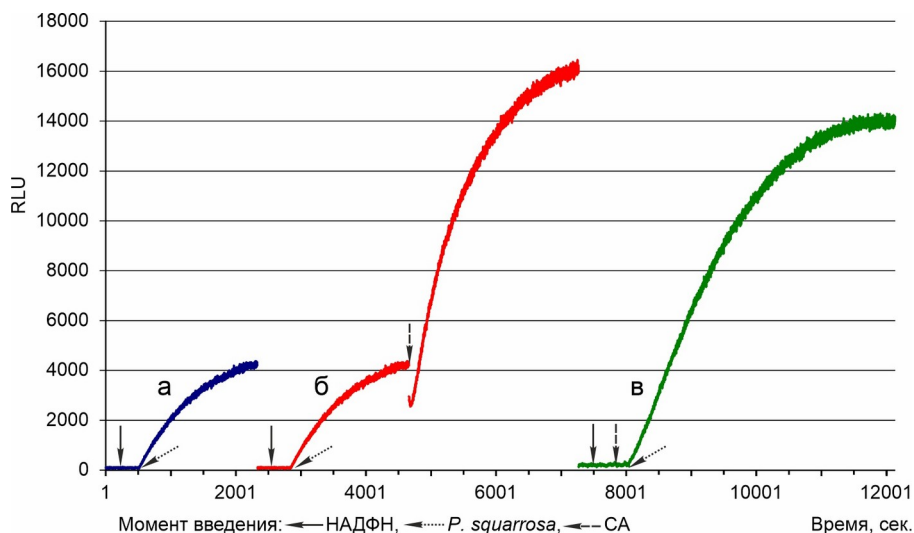


Рисунок 1 - Люминесценция системы 2371 при внесении в реакционную среду СА

Примечание: а - 50 мкл системы + 5 мкл НАДФН + 5 мкл экстракта *P. squarrosa*; б - 50 мкл системы + 5 мкл НАДФН + 5 мкл экстракта *P. squarrosa* + 5 мкл СА; в - 50 мкл системы + 5 мкл НАДФН + 5 мкл СА + 5 мкл экстракта *P. squarrosa*

Результаты, представленные на рис 1, отражают начальный, относительно небольшой по времени, этап люминесцентной реакции. Полностью эволюция люминесценции в реакции *in vitro* с момента инициации до практически полного затухания может достигать двух и более часов (рис. 2). Для образцов без и с добавлением стимулятора можно количественно сравнить параметры люминесценции – пиковое значение регистрируемого сигнала и квантовый выход, который определяется как площадь под кривой зависимости люминесценции от времени. Максимальное значение интенсивности люминесценции и квантовый выход для образца с добавлением СА (143823 и 376860672 RLU) более чем в семь раз превышают эти показатели для образца без добавления стимулятора (20286 и 51660704 RLU).

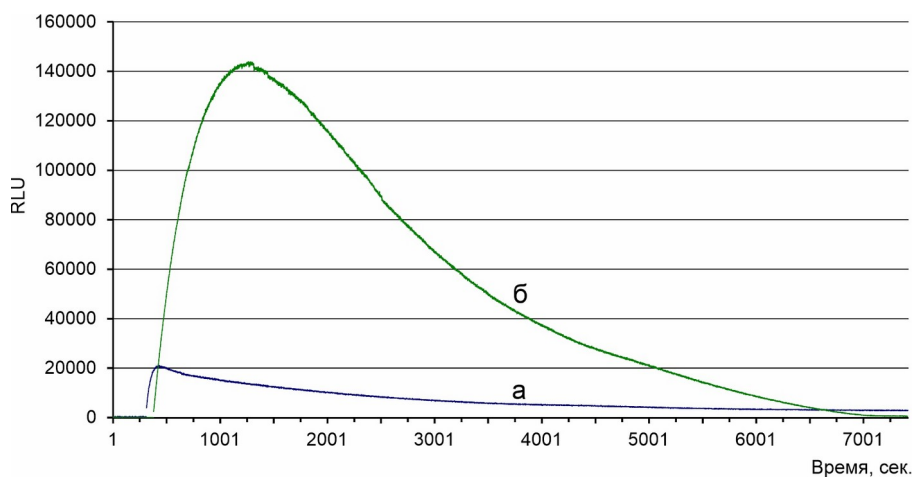


Рисунок 2 - Изменение кинетики люминесценции при внесении 5 мкл СА к 50 мкл ферментной системы 2371 содержащей 5 мкл НАДФН и 5 мкл экстракта *P. squarrosa*

Примечание: а – ферментная система, не содержащая СА; б – ферментная система, содержащая СА

Таким образом установлено следующее:

- а) выделена ферментная система *M. gombakensis* не содержащая эндогенный субстрат люминесцентной реакции;
- б) СА не является субстратом ферментной люминесцентной системы 2371;
- в) при использовании экзогенного субстрата СА увеличивает квантовый выход люминесцентной реакции и максимальное значение сигнала.

Ферментная система *M. gombakensis*, содержащая эндогенный субстрат. Отличие люминесценции ферментной системы 2371, имеющей эндогенный субстрат от люминесценции ферментной системы, не имеющей эндогенный субстрат заключается в продуцировании квантов света при внесении раствора НАДФН (рис. 3а).

Последующее внесение СА вызывает увеличение люминесценции. Следовательно, СА участвует в продуцировании квантов света на основе эндогенного субстрата *M. gombakensis*.

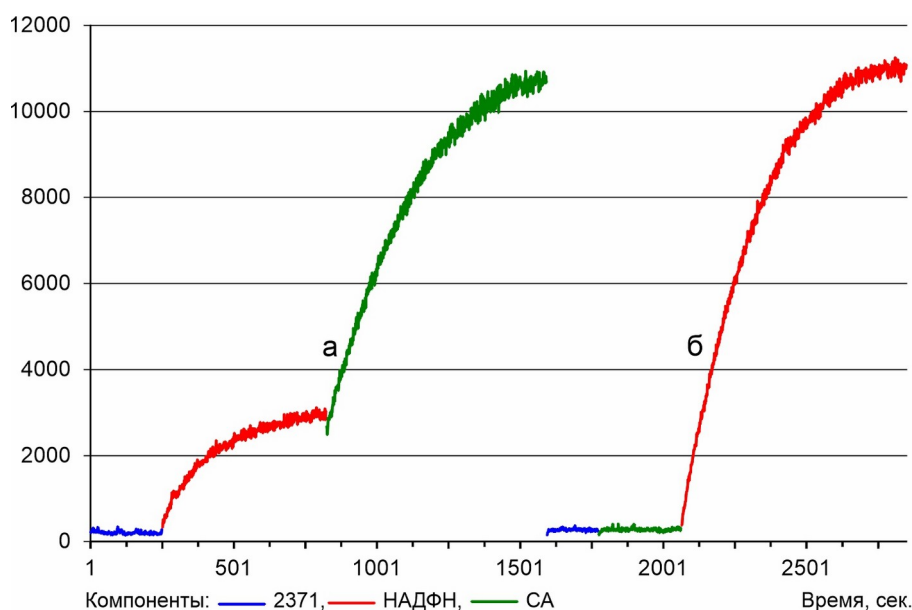


Рисунок 3 - Люминесценция системы 2371, имеющей эндогенный субстрат, при различной последовательности внесении в реакцию среду СА и НАДФН

Если СА добавляется к ферментной системе первым (рис. 3), интенсивность регистрируемого сигнала не меняется. Следовательно, СА не содержит НАДФН, что подтверждается возрастанием люминесценции сигнала при последующем добавлении раствора НАДФН.

Люминесценция пеллет. Визуализация люминесценции пеллет *M. gombakensis* на гель-документирующей системе GelDoc XR Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) при добавлении СА представлена на рис. 4.

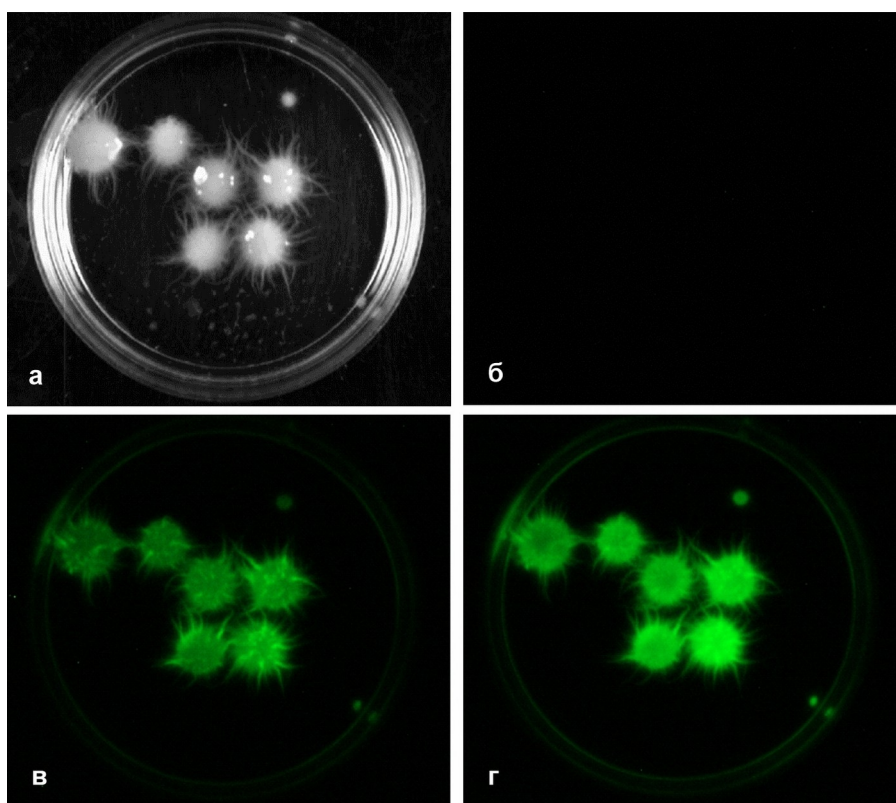


Рисунок 4 - Регистрация увеличения люминесценции пеллет культуры 2371 при добавлении СА

Примечание: а – пеллеты при внешнем освещении; б – отсутствие люминесцентного сигнала, достаточно для визуализации; в – люминесценция пеллет через 15 минут после добавления СА; г – люминесценция пеллет через 30 минут после добавления СА

Регистрация на люминометре кинетики и интенсивности люминесценции пеллет *M. gombakensis* при добавлении СА представлены на рис. 5. Как следует из представленных данных, СА, не являющийся субстратом ферментной люминесцентной системы и не содержащий НАДФН, *in vivo* стимулирует люминесценцию пеллет *M. gombakensis*.

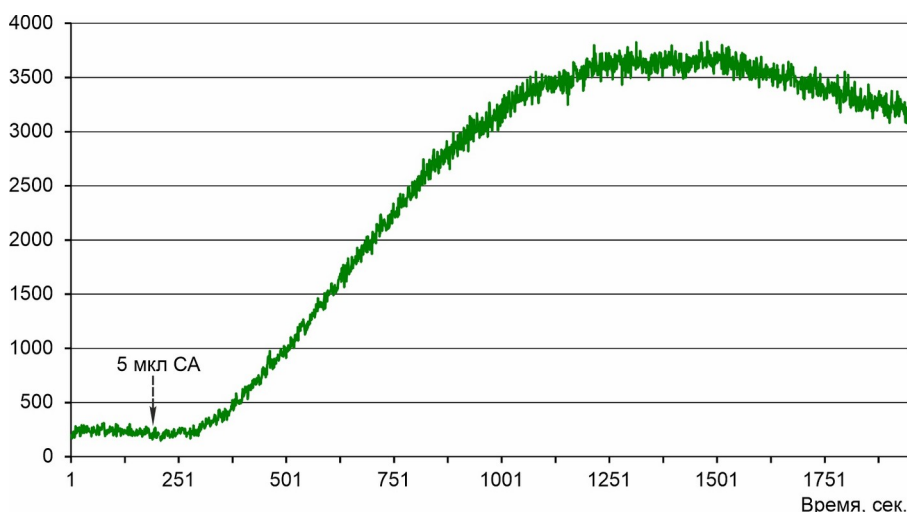


Рисунок 5 - Стимуляция люминесценции пеллеты культуры 2137 после добавления 5 мкл СА

Заключение

В результате проведенных исследований на ферментной системе светящегося базидиомицета *M. gombakensis* установлено, что СА не содержит компоненты биoluminesцентной реакции. СА является стимулятором люминесцентной реакции. При его добавлении в несколько раз увеличивается интенсивность люминесценции *in vivo* пеллет *M. gombakensis* и выделенных из них ферментных систем *in vitro*. Механизм стимулирующего эффекта СА в настоящее время не известен. Можно предположить, что СА изменяет свойства субстрата или переводит продукт реакции в субстрат реакции. Полученные результаты дополняют известную схему люминесценции базидиомицетов и требуют дополнительных исследований, прежде всего в части идентификации химических соединений СА, непосредственно отвечающих за стимуляцию.

Конфликт интересов

Не указан.

Conflict of Interest

None declared.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

- Oliveira A.G. The enzymatic nature of fungal bioluminescence / A.G. Oliveira, C.V. Stevani // Photochem Photobiol Sci. — 2009. — 8. — p. 1416–1421.
- Airth R.L. Enzymes Associated with the Bioluminescence of *Panus stipticus luminescens* and *Panus stipticus non-luminescens* / R.L. Airth, G.E. Foerster // J of Bacteriology. — 1964. — 88. — p. 1372–1379.
- Liu X. Chemistry in Fungal Bioluminescence: Theoretical Studies on Biosynthesis of Luciferin from Caffeic Acid and Regeneration of Caffeic Acid from Oxidized Luciferin / X. Liu, M. Wang, Y. Liu // J Fungi. — 2023. — 9. — p. 369.
- Shakhova E.S. An improved pathway for autonomous bioluminescence imaging in eukaryotes / E.S. Shakhova, T.A. Karataeva, N.M. Markina et al. // Nat Methods. — 2024. — 21. — p. 406–410.
- Oliveira A.G. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages / A.G. Oliveira, A.P. Desjardin, B.A. Perry et al. // Photochem Photobiol Sci. — 2012. — 11. — p. 848–852.
- Puzyr A.P. Luminescence of cold extracts from mycelium of luminous basidiomycetes during long-term storage / A.P. Puzyr, S.E. Medvedeva, K.S. Artemenko et al. // Curr Res Environ Appl Mycol. — 2017. — 7. — p. 227–235.
- Oba Y. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body / Y. Oba, Y. Suzuki, G.N.R. Martins et al. // Photochem Photobiol Sci. — 2009. — 8. — p. 1416–1421.
- Посохина Е.Д. О возможности использования базидиомицета *Inonotus obliquus* для биотехнологического получения биологически активного вещества гиспидина / Е.Д. Посохина, А. Пузырь, Н.О. Ронжин и др. // Международный научно-исследовательский журнал. — 2024. — 1(139).
- Гугля Е.Б. Возможна ли биoluminesценция у растений? / Е.Б. Гугля, А.А. Котлобай, Е.К. Секретова и др. // Вестник РГМУ. — 2017. — 2. — с. 61–71.

10. Puzyr A.P. The use of glowing wood as a source of luminescent culture of fungus mycelium / A.P. Puzyr, S.E. Medvedeva, V.S. Bondar // *Mycosphere*. — 2016. — 7(1). — p. 1–17.
11. Puzyr A.P. Two forms of substrate for the bioluminescent reaction in three species of basidiomycetes / A.P. Puzyr, A.E. Burov, S.E. Medvedeva et al. // *Mycology*. — 2019. — 10(2). — p. 84–91.
12. O’Kane D.J. Spectral analysis of bioluminescence of *Panellus stypticus* / D.J. O’Kane, W.L. Lingle, D. Porter et al. // *Mycologia*. — 1990. — 82. — p. 607–616.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Oliveira A.G. The enzymatic nature of fungal bioluminescence / A.G. Oliveira, C.V. Stevani // *Photochem Photobiol Sci*. — 2009. — 8. — p. 1416–1421.
2. Airth R.L. Enzymes Associated with the Bioluminescence of *Panus stipticus luminescens* and *Panus stipticus non-luminescens* / R.L. Airth, G.E. Foerster // *J of Bacteriology*. — 1964. — 88. — p. 1372–1379.
3. Liu X. Chemistry in Fungal Bioluminescence: Theoretical Studies on Biosynthesis of Luciferin from Caffeic Acid and Regeneration of Caffeic Acid from Oxidized Luciferin / X. Liu, M. Wang, Y. Liu // *J Fungi*. — 2023. — 9. — p. 369.
4. Shakhova E.S. An improved pathway for autonomous bioluminescence imaging in eukaryotes / E.S. Shakhova, T.A. Karataeva, N.M. Markina et al. // *Nat Methods*. — 2024. — 21. — p. 406–410.
5. Oliveira A.G. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages / A.G. Oliveira, D.E. Desjardin, B.A. Perry et al. // *Photochem Photobiol Sci*. — 2012. — 11. — p. 848–852.
6. Puzyr A.P. Luminescence of cold extracts from mycelium of luminous basidiomycetes during long-term storage / A.P. Puzyr, S.E. Medvedeva, K.S. Artemenko et al. // *Curr Res Environ Appl Mycol*. — 2017. — 7. — p. 227–235.
7. Oba Y. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body / Y. Oba, Y. Suzuki, G.N.R. Martins et al. // *Photochem Photobiol Sci*. — 2009. — 8. — p. 1416–1421.
8. Posohina E.D. O vozmozhnosti ispol'zovanija bazidiomitseta *Inonotus obliquus* dlja biotehnologicheskogo poluchenija biologicheskogo aktivnogo veschestva gispidina [On the possibility of using the basidiomycete *Inonotus obliquus* for biotechnological production of the biologically active substance hispidin] / E.D. Posohina, A. Puzyr', N.O. Ronzhin et al. // *International Research Journal*. — 2024. — 1(139). [in Russian]
9. Guglja E.B. Vozmozhna li bioluminescencija u rastenij? [Bioluminescence: is it possible for a plant?] / E.B. Guglja, A.A. Kotlobaj, E.K. Sekretova et al. // *Bulletin of RSMU*. — 2017. — 2. — p. 61–71. [in Russian]
10. Puzyr A.P. The use of glowing wood as a source of luminescent culture of fungus mycelium / A.P. Puzyr, S.E. Medvedeva, V.S. Bondar // *Mycosphere*. — 2016. — 7(1). — p. 1–17.
11. Puzyr A.P. Two forms of substrate for the bioluminescent reaction in three species of basidiomycetes / A.P. Puzyr, A.E. Burov, S.E. Medvedeva et al. // *Mycology*. — 2019. — 10(2). — p. 84–91.
12. O’Kane D.J. Spectral analysis of bioluminescence of *Panellus stypticus* / D.J. O’Kane, W.L. Lingle, D. Porter et al. // *Mycologia*. — 1990. — 82. — p. 607–616.