

МИКОЛОГИЯ / MYCOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.153.59>ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СОКА АРБУЗА НА ЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ РЕАКЦИЮ БАЗИДИОМИЦЕТА
MYCENA GOMBAKENSIS

Научная статья

Пузырь А.П.¹, Посохина Е.Д.^{2*}, Буров А.³²ORCID : 0000-0002-8276-9213;³ORCID : 0000-0002-4360-0335;^{1,2,3}Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии, Красноярск, Российская Федерация³Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий, Красноярск, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (posokhinaed[at]bk.ru)

Аннотация

В работе представлены результаты исследования стимуляции арбузным соком люминесценции *in vivo* мицелия пеллет гриба *Mycena gombakensis* и *in vitro* выделенных из мицелия ферментных люминесцентных систем. Показано, что арбузный сок не является ни субстратом ферментной люминесцентной системы, ни НАДФН. Однако его добавка к люминесцентной системе, содержащей эндогенный субстрат и активированной НАДФН, приводит к увеличению люминесцентного сигнала. Наблюдается стимуляция люминесценции ферментной системы без эндогенного субстрата, с предварительной добавкой НАДФН и экзогенного субстрата. Добавление арбузного сока к воде, в которой находятся пеллеты, также приводит к увеличению интенсивности люминесценции.

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

STUDY OF THE EFFECT OF WATERMELON JUICE ON THE LUMINESCENCE RESPONSE OF THE
BASIDIOMYCETE *MYCENA GOMBAKENSIS*

Research article

Puzyr A.P.¹, Posokhina E.D.^{2*}, Burov A.³²ORCID : 0000-0002-8276-9213;³ORCID : 0000-0002-4360-0335;^{1,2,3}Institute of Biophysics of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation³Federal Research Center for Information and Computational Technologies, Krasnoyarsk, Russian Federation

* Corresponding author (posokhinaed[at]bk.ru)

Abstract

The paper presents the results of a study on stimulation of luminescence *in vivo* of the mycelium of *Mycena gombakensis* pellets by watermelon juice and *in vitro* of enzymatic luminescent systems isolated from the mycelium. It is shown that the watermelon juice is not a substrate of the enzymatic luminescent system or NADPH. However, its addition to the luminescent system containing an endogenous substrate and activated by NADPH leads to an increase in the luminescent signal. Stimulation of the luminescence of the enzymatic system without an endogenous substrate is observed with the preliminary addition of NADPH and the exogenous substrate. Addition of watermelon juice to water pellets also leads to an increase in the luminescence intensity.

Keywords: bioluminescence, luminous basidiomycetes, *Mycena gombakensis*, enzyme system, stimulator.

Введение

В последнее десятилетие был сделан значительный шаг к пониманию механизма грибной биолюминесценции. Было установлено, что грибное свечение обусловлено рядом последовательных ферментативных реакций и представляет собой замкнутый цикл. На начальном этапе кофейная кислота преобразуется в гиспидин, затем из гиспидина, в присутствии фермента гиспидин-3-гидроксилазы, образуется люциферин. Люциферин окисляется в присутствии люциферазы до оксилюциферина, который и излучает кванты света. Оксилюциферин может быть ферментативно преобразован в кофейную кислоту и цикл повторяется [1], [2], [3]. Светящиеся грибы, по всей видимости, обладают единым механизмом биолюминесценции и содержат общий набор необходимых компонентов, в том числе и гиспидин, как предшественник субстрата ферментативной реакции [4], [5].

При проведении исследовательских работ с использованием грибных люминесцентных систем *in vivo* и *in vitro*, в том числе оценивают эффекты различных веществ на интенсивность люминесценции. Интерес вызывают вещества стимуляторы, добавка которых приводит к увеличению интенсивности люминесцентного сигнала, но которые при этом не являются компонентами ферментной люминесцентной системы (фермент, субстрат, НАДФН). Экстракты из биомассы грибов [1], [5], [6], культуральные жидкости от выращивания грибного мицелия [6], [7] и экстракты некоторых растений [8], вероятно, не стоит относить к стимуляторам, так как они содержат гиспидин.

Ранее мы сообщали [9] о том, что внесение сока ананаса к пеллетам базидиомицета *Mycena gombakensis* стимулирует люминесцентную систему пеллет *in vivo*. Увеличение люминесценции характерно и при добавлении сока

ананаса к ферментным системам *in vitro* выделенным из мицелия. При этом экспериментально показано, что сок ананаса не содержит субстрат люминесцентной реакции и НАДФН.

В данной работе основное внимание уделяется влиянию арбузного сока (АС) на люминесценцию гриба *M. gombakensis* в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Как показали исследования, АС не содержит ни субстрат ферментной системы гриба *M. gombakensis*, ни НАДФН, однако, его добавка к мицелию и к выделенной ферментной системе приводит к увеличению люминесценции.

Методы и принципы исследования

Арбузы, выращенные в Алтайском крае, Рубцовском районе, п. Березовка, приобретены в торговой сети города Красноярск. АС получали отжимом из мякоти плода с использованием ручного пресса с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 16000g на центрифуге Avanti J-E (Beckman-Coulter, США). Полученные образцы сока были лиофильно высушены (ЛС-500 (Россия)) и хранились до момента использования при -20°C. Лиофильная сушка позволяет осуществлять длительное хранение образцов без потери активности, а также при необходимости получить образцы с большей концентрацией. Перед проведением исследований образцы разводились в деионизованной воде Milli-Q system (Millipore, США).

В работе была использована культура обладающего свечением базидиомицета *M. gombakensis* (культура 2371) из Коллекции Института биофизики СО РАН. Жидкая картофельно-сахарозная среда (200 г/л картофеля, 20 г/л сахарозы) использовалась для наращивания мицелия гриба *M. gombakensis*. Глубинное культивирование проводили в колбах Эрленмейера, содержащих жидкую питательную среду при температуре 27°C с постоянным перемешиванием. Для получения пленочного мицелия культивирование осуществляли стационарно в чашках Петри, содержащих жидкую питательную среду, при температуре 27°C. Подробнее используемые методы культивирования описаны в работах [10], [11].

Полученные методом глубинного культивирования мицелиальные пеллеты в форме глобул отмывали деионизованной водой в течение суток и использовали для проведения экспериментов *in vivo*. В пробирку, содержащую 300 мкл воды помещали пеллету и прописывали базовый сигнал люминесценции. После чего аккуратно, без перемешивания вносили исследуемый образец АС и регистрировали изменения люминесцентного сигнала.

Холодные экстракты, выделенные из мицелия гриба *M. gombakensis* и содержащие ферментную люминесцентную систему, использовали для оценки влияния АС в экспериментах *in vitro*. Ферментные системы получали по методике, описанной ранее [10], [11]. Полученный из плодовых тел не светящегося гриба *Pholiota squarrosa* горячий экстракт, использовали в качестве экзогенного субстрата для ферментной люминесцентной системы. Способ получения горячего экстракта описан в работе [10].

Регистрацию люминесцентных сигналов *in vivo* и *in vitro* систем проводили на люминометре Glomax 20/20 (Promega BioSystems Sunnyvale, Inc., США), с режимом регистрации одно измерение в секунду.

Спектр биолюминесценции был получен с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Измерения проводили следующим образом: в кварцевую кювету спектрофлуориметра, содержащую ферментную люминесцентную систему из гриба *M. gombakensis* и НАДФН, последовательно вносили экстракт *P. squarrosa* и регистрировали спектр биолюминесценции, а затем добавляли АС и вновь регистрировали спектр.

Гель-документирующая система GelDoc XR Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) была использована для визуальной регистрации люминесцентного сигнала пеллет. Черно-белые изображения люминесцентных областей были преобразованы в цветные с использованием программного обеспечения.

Основные результаты и обсуждение

3.1. Влияние АС на люминесцентные системы, выделенные из биомассы гриба *M. gombakensis*

В работе были использованы 2 вида ферментных систем, выделенных из мицелия гриба *M. gombakensis*, не имеющая эндогенного субстрата и содержащая эндогенный субстрат.

Отсутствие изменения в люминесцентном сигнале ферментной системы после внесения НАДФН свидетельствует о том, что система не содержит эндогенный субстрат. (Рис.1). Отсутствие изменений в регистрируемом сигнале ферментной системы, активированной НАДФН, после внесения АС означает, что сок не является субстратом люминесцентной системы (Рис.1).

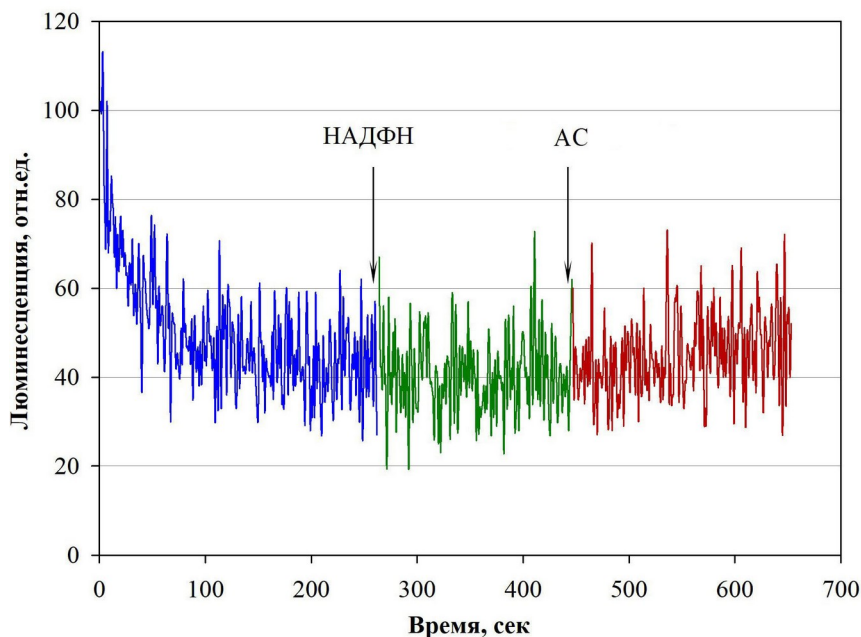


Рисунок 1 - Интенсивность люминесценции ферментной системы из гриба *M. gombakensis* при добавке АС
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.153.59.1>

Примечание: стрелками указаны моменты последовательного внесения НАДФН и АС

Увеличение люминесцентного сигнала ферментной системы *in vitro* при последовательном внесении НАДФН и экстракта из *P. squarrosa* свидетельствует, во-первых, о работоспособности ферментов данной системы, во-вторых, о наличии в экстракте *P. squarrosa* экзогенного субстрата, используемого ферментной системой из мицелия гриба *M. gombakensis* (Рис.2). Последующая добавка АС к ферментной системе дополнительно увеличивает люминесценцию (Рис.2). Следовательно, АС является стимулятором люминесцентной реакции.

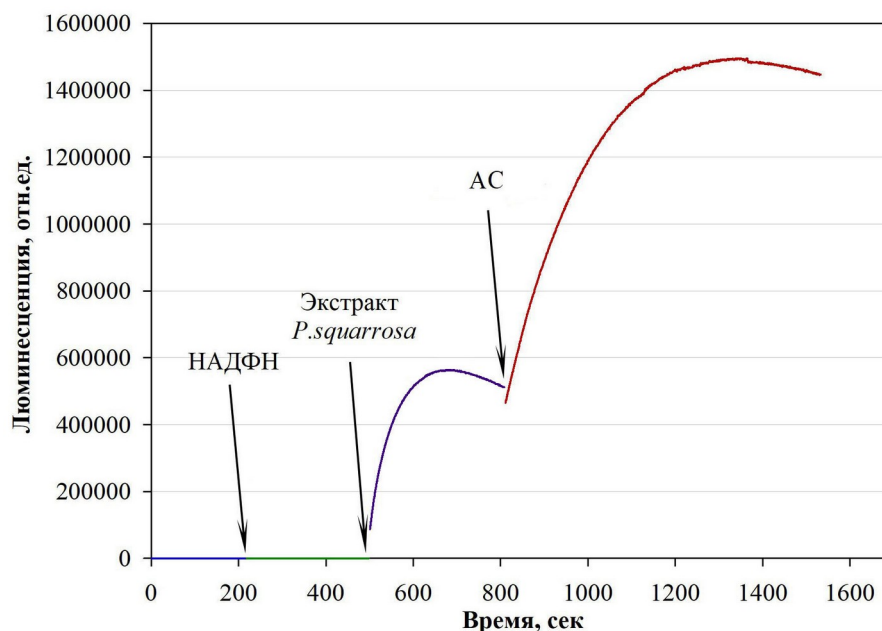


Рисунок 2 - Стимуляция люминесценции ферментной системы без эндогенного субстрата, выделенной из гриба *M. gombakensis* после добавки АС
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.153.59.2>

Примечание: стрелками указаны моменты последовательного внесения: НАДФН, экстракта из *P. squarrosa* и АС

При добавке НАДФН к ферментной люминесцентной системе, имеющей эндогенный субстрат, наблюдается увеличение интенсивности люминесцентного сигнала (Рис.3а). В то же время добавка АС к ферментной системе не приводит к изменению люминесцентного сигнала, что свидетельствует о том, что АС не содержит НАДФН (Рис.3б). Увеличение люминесцентного сигнала после добавки АС (Рис.3а) или НАДФН (Рис.3б) свидетельствует о том, что АС является стимулятором данной люминесцентной системы.

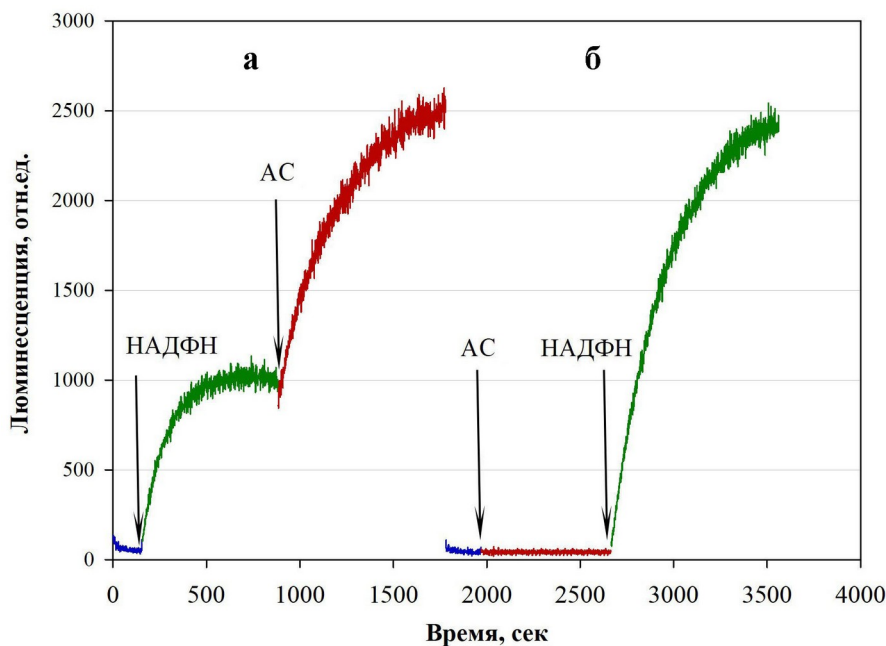


Рисунок 3 - Стимуляция люминесценции ферментной системы, содержащей эндогенный субстрат, выделенной из гриба *M. gombakensis* после добавки АС
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.153.59.3>

Примечание: стрелками указаны моменты внесения: НАДФН и АС

3.2. Влияние сока арбуза на люминесценцию мицелия пеллет гриба *M. gombakensis*

АС является стимулятором люминесценции ферментных систем *in vitro* с экзогенным (Рис.2) и эндогенным субстратом (Рис.3а), а также стимулирует ферментную систему мицелия пеллет *in vivo*, содержащих эндогенный субстрат (Рис. 4,5).

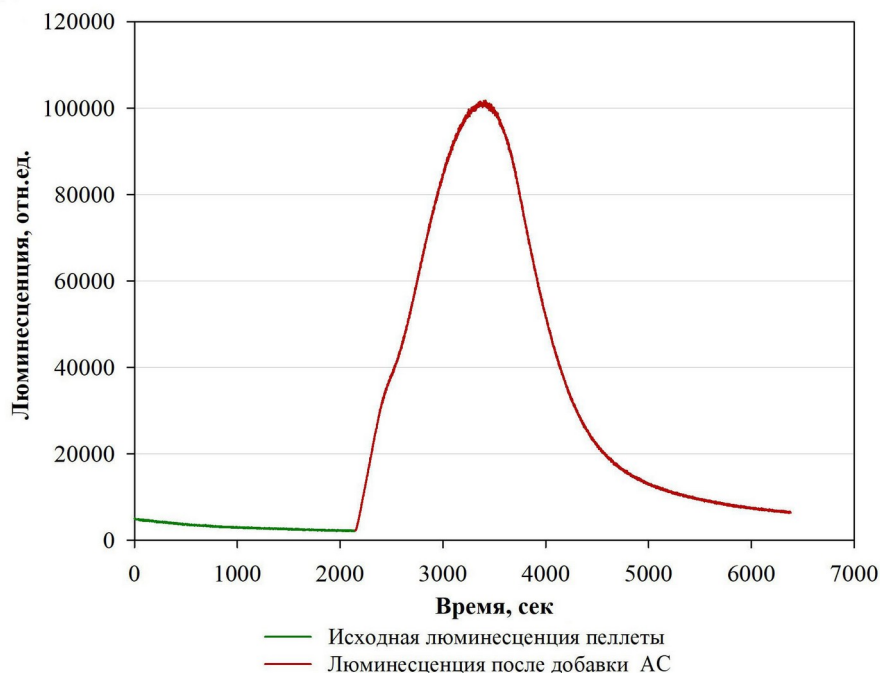


Рисунок 4 - Изменение интенсивности люминесценции пеллеты *M. gombakensis* после добавления в воду АС
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.153.59.4>

Использование гель-документирующей системы позволяет визуализировать развитие люминесцентного сигнала в ходе эксперимента (Рис.5). Первоначально регистрировали изображения внешнего вида пеллет находящихся в воде (Рис.5а) с низким уровнем исходного свечения (Рис.5б). После добавления АС в воду наблюдается постепенное увеличение интенсивности люминесцентного сигнала пеллет. Разница в интенсивности люминесценции до и после внесения АС видна уже через пять минут (Рис.5в). Максимальный люминесцентный сигнал достигается через 30 минут после обработки пеллет АС (Рис.5г). Полученный результат свидетельствует о том, что АС содержит стимулятор люминесценции мицелия пеллет гриба *M. gombakensis*. Интенсивность люминесценции является индивидуальной для каждой пеллеты и может быть локальной в пределах пеллеты.

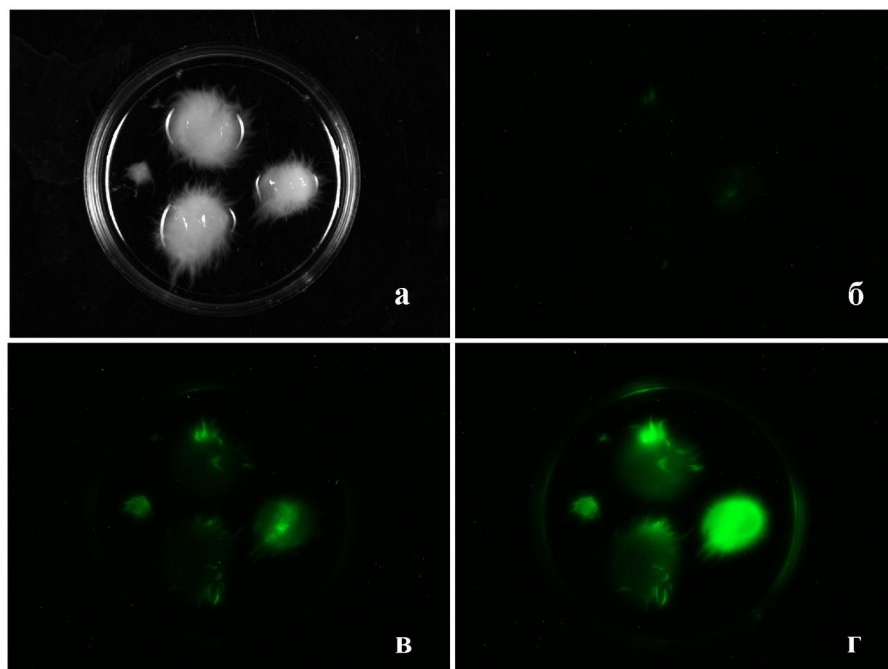


Рисунок 5 - Динамика люминесценции пеллет мицелия культуры *M. gombakensis*:
а – внешний вид пеллет; б – исходное свечение пеллет; в – свечение после добавления в воду АС через 5 минут; г – свечение после добавления АС через 30 минут
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.153.59.5>

3.3. Спектр биолюминесценции

Измерение спектров биолюминесценции ферментативной люминесцентной реакции после добавления экстракта *P. squarrosa* и АС показало, что максимум биолюминесценции в обоих случаях составляет 520 нм (Рис.6).

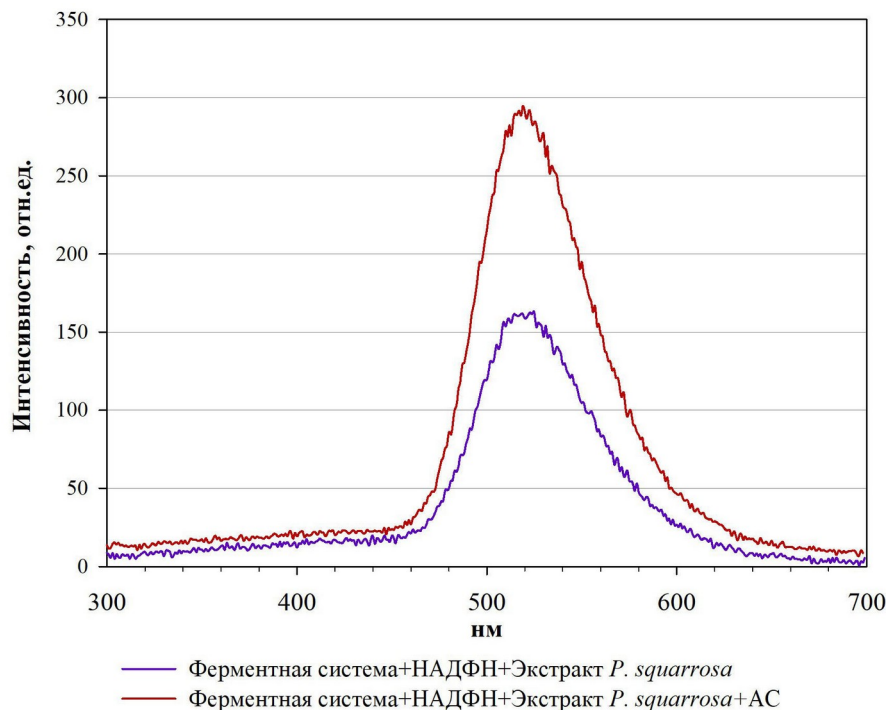


Рисунок 6 - Спектры биолюминесценции ферментной системы после добавки экстракта *P. squarrosa* (экзогенный субстрат) и после последующей добавки АС (стимулятор)
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.153.59.6>

Заключение

В ходе работы была выявлена стимуляция АС люминесценции ферментной системы (*in vitro*) и мицелия пеллет (*in vivo*) базидиального гриба *M. gombakensis*. При этом показано, что АС не является ни субстратом выделенной ферментной системы, ни НАДФН. Механизм стимулирующего эффекта пока не ясен и требует дальнейших исследований.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FWES-2024-0018).

Конфликт интересов

Не указан.

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.

Funding

The research was carried out within the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FWES-2024-0018).

Conflict of Interest

None declared.

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

1. PurtoV K.V. The chemical basis of fungal bioluminescence / K.V. PurtoV, V.N. Petushkov, M.S. Baranov [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2015. — № 54. — P. 8124–8128.
2. Kasnova Z.M. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence / Z.M. Kasnova, F.A. Dörr, V.N. Petushkov [et al.] // *Sci. Adv.* — 2017. — № 3.
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.
4. 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.
5. 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.* — 2017. — № 16.

6. 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).
7. Посохина Е.Д. О возможности использования базидиомицета *Inonotus obliquus* для биотехнологического получения биологически активного вещества гиспидина / Е.Д. Посохина, А.П. Пузырь, Н.О. Ронжин [и др.] // *Международный научно-исследовательский журнал*. — 2023. — № 1 (139).
8. Tu P.T.B. Anti-Obesity Effects of Hispidin and *Alpinia zerumbet* Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes / P.T.B. Tu, S. Tawata // *Molecules*. — 2014. — № 19 (10).
9. Пузырь А.П. Стимулирование люминесцентной реакции базидиомицета *Mycena gombakensis* соком ананаса / А.П. Пузырь, Е.Д. Посохина, А.Е. Буров // *Международный научно-исследовательский журнал*. — 2024. — № 8 (146).
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).
11. 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.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Purto K.V. The chemical basis of fungal bioluminescence / K.V. Purto, V.N. Petushkov, M.S. Baranov [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2015. — № 54. — P. 8124–8128.
2. Kasnova Z.M. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence / Z.M. Kasnova, F.A. Dörr, V.N. Petushkov [et al.] // *Sci. Adv.* — 2017. — № 3.
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.
4. 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.
5. 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.* — 2017. — № 16.
6. 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).
7. Posohina E.D. O vozmozhnosti ispol'zovanija bazidiomitseta *Inonotus obliquus* dlja biotehnologicheskogo poluchenija biologicheskogo aktivnogo veschestva gispidina [On the possibility of using basidiomycete *Inonotus obliquus* for biotechnological production of biologically active substance hispidin] / E.D. Posohina, A.P. Puzyr', N.O. Ronzhin [et al.] // *International Research Journal*. — 2023. — № 1(139). [in Russian]
8. Tu P.T.B. Anti-Obesity Effects of Hispidin and *Alpinia zerumbet* Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes / P.T.B. Tu, S. Tawata // *Molecules*. — 2014. — № 19 (10).
9. Puzyr' A.P. Stimulirovanie ljuminestsentnoj reaktsii bazidiomitseta *Mycena gombakensis* sokom ananasa [Stimulation of the luminescent resoinse of the basidiomycete *Mycena gombakensis* by pineapple juice] / A.P. Puzyr', E.D. Posohina, A.E. Burov // *International Research Journal*. — 2024. — № 8 (146). [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).
11. 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.