

**ЭФФЕКТЫ КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ, ГИСПИДИНА И ОБНАРУЖЕННОГО  
СТИМУЛИРУЮЩЕГО КОМПОНЕНТА НА СВЕЧЕНИЕ МИЦЕЛИЯ  
И ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ БАЗИДИОМИЦЕТА  
*Neonothopanus nambi***

© 2024 г. Н.О. Ронжин\*., Е.Д. Посохина\*, В.М. Ле\*\*, О.А. Могильная\*, Ю.В. Захарова\*\*\*, А.С. Сухих\*\*, В.С. Бондарь\*

\*Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

\*\*Кемеровский государственный университет, Красная ул., 6, Кемерово, 650000, Россия

\*\*\*Кемеровский государственный медицинский университет, ул. Ворошилова, 22а, Кемерово, 650056, Россия

#E-mail: roniol@mail.ru

Поступила в редакцию 24.01.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

*In vivo* установлено, что добавки кофейной кислоты и обнаруженного нами низкомолекулярного стимулятора биолюминесценции к мицелию светящегося гриба *Neonothopanus nambi* приводят к быстрому и значительному (на порядок и более) увеличению интенсивности его световой эмиссии. Высказано предположение, что наблюдаемый эффект активации грибного свечения может быть опосредован окислением добавляемых веществ ферментами лигнинолитического комплекса базидиомицетов (в частности, пероксидазами) с излучением квантов видимого света. В параллельных экспериментах *in vivo* показано, что добавки гиспидина (предшественника люциферина светящихся высших грибов) не влияют на интенсивность световой эмиссии мицелия. В то же время в исследованиях *in vitro* установлено, что кофейная кислота и обнаруженный низкомолекулярный стимулятор свечения не влияют на уровень светоизлучения выделенной из мицелия *N. nambi* ферментной люминесцентной системы в присутствии НАДФН и существенным образом подавляют реакцию излучения системы, активированной НАДФН и гиспидином. Совокупность полученных данных указывает на наличие в светящихся высших грибах разных биохимических путей генерации квантов видимого света с участием разных ферментов (или ферментных систем) и разных субстратов.

*Ключевые слова:* светящиеся высшие грибы, люминесцентная система, кофейная кислота, гиспидин, стимулятор свечения, механизм свечения грибов.

DOI: 10.31857/S0006302924030128, EDN: OEVVJ

Светящиеся виды высших грибов распространены в разных регионах земного шара, особенно в субтропической и тропической зонах с наиболее благоприятными условиями их обитания [1–4]. Светящиеся базидиомицеты излучают зеленоватый свет с максимумом эмиссии 520–530 нм [5–7]. При этом у некоторых видов высших грибов наблюдается свечение всего плодового тела [8–10]; у иных видов может светиться только шляпка, или только ножка [11, 12], или только мицелий и ризоморфы [2, 6]. Известно, что светящиеся базидиомицеты являются грибами белой гнили, способными к деградации лигнина [6], и, как правило, являются сапрофитами (реже патогенами) растений [5].

За последние десять лет в изучении грибной биолюминесценции достигнуты заметные успехи [13–22]. Так, в настоящее время считается доказанным, что предшественником люциферина люминесцентной реакции базидиомицетов является их вторичный метаболит гиспидин [14]. В исследованиях с «холодными» и «горячими» экстрактами из разных видов светящихся грибов (*Neonothopanus nambi*, *Mycena citricolor*, *Panellus stipticus*, *Armillaria borealis*) авторы данной работы установили, что в присутствии O<sub>2</sub> и НАДФН гиспидин сначала преобразуется НАДФН-зависимой гидроксилазой в люциферин (3-гидрокси-гиспидин), который затем окисляется в присутствии кислорода нерастворимой люциферазой с излучением кванта видимого света. Позднее было

показано, что образующийся в реакции излучения оксילוциферин ферментативно гидролизуются до кофейной кислоты, которая является предшественником биосинтеза гиспидина [18]. Надо сказать, что двухстадийный механизм грибной люциферин-люциферазной реакции, обеспечивающей биолюминесценцию *in vitro*, впервые был предложен в середине прошлого века на основании экспериментов с «холодными» и «горячими» экстрактами из светящихся базидиомицетов [23–25] и подтвержден в исследованиях в новом тысячелетии [26, 27].

В то же время, несмотря на успехи, достигнутые в изучении механизма грибной биолюминесценции, некоторые биохимические аспекты этого феномена не до конца понятны и требуют дальнейшего изучения. В частности, до сих пор остается неясным, какой фермент (или ферментный комплекс) выполняет в светящихся базидиомицетах функцию люциферазы, так как он не выделен в чистом виде и не охарактеризован. Не менее важные вопросы состоят в том, является ли люциферин-люциферазный механизм единственным механизмом грибного свечения, или генерация квантов видимого света в базидиомицетах осуществляется разными биохимическими путями с участием разных ферментов (или ферментных систем) и является ли 3-гидроксигиспидин единственным субстратом грибной люминесцентной реакции.

Светоизлучающий базидиомицет *Neonothopanus nambi* является хорошо известным объектом в исследованиях механизмов биолюминесценции высших грибов. У гриба *N. nambi* наблюдается свечение всего плодового тела, мицелия и ризоморф. Из мицелия этого базидиомицета впервые был получен «холодный» экстракт, содержащий ферментную люминесцентную систему, которая обеспечивала свечение экстракта *in vitro* [13]. Позднее «холодные» экстракты, содержащие активные люминесцентные системы, были получены также из мицелия светящихся высших грибов *A. borealis* и *M. citricolor* [17].

Недавно в экстрактах из мицелия гриба *N. nambi* после его обработки  $\beta$ -глюкозидазой нами был обнаружен компонент, значительно увеличивающий уровень грибной биолюминесценции *in vivo* [22]. Было установлено, что стимулирующий свечение компонент является термостабильным низкомолекулярным соединением, обладающим флуоресценцией с максимумом эмиссии при 440 нм после возбуждения длинами волн 350–370 нм [22].

В предлагаемой работе нами представлены результаты сравнительных исследований *in vivo* и *in vitro* по влиянию кофейной кислоты, гиспидина и обнаруженного стимулятора на интенсивность свечения мицелия базидиомицета *N. nambi* и вы-

деленной из него ферментной люминесцентной системы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура базидиального гриба.** В исследованиях использовали светящийся мицелий высшего гриба *Neonothopanus nambi* (штамм IBSO 2391) из Коллекции микроорганизмов (CCIBSO 836) Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия).

**Получение и подготовка пеллет мицелия для исследований.** Эксперименты проводили с шарообразными пеллетами светящегося мицелия *N. nambi*, которые получали при культивировании базидиомицета в погруженных условиях в жидкой питательной среде PDB (HiMedia Laboratory, Индия) изложенным нами ранее способом [28]. Выращенные пеллеты извлекали из питательной среды, многократно промывали деионизированной водой (Milli-Q system, Millipore, США), после чего инкубировали в деионизированной воде в течение 20–24 ч при медленном перемешивании со скоростью 60–80 об./мин (шейкер OS-10, Biosan, Латвия) для более полного удаления остатков питательной среды и метаболитов. Отмытые пеллеты мицелия использовали: для исследований *in vivo*; для получения разработанным нами способом [13] «холодных» экстрактов, содержащих ферментную люминесцентную систему; для получения предложенным нами методом [22] водных экстрактов, содержащих низкомолекулярный стимулятор грибного свечения *in vivo*.

**Методы.** «Холодные» экстракты, содержащие ферментную люминесцентную систему базидиомицета *N. nambi*, выделяли из биомассы мицелия при температуре 0–4°C. Пеллеты мицелия извлекали из деионизированной воды (см. выше) и механически разрушали протираем через металлическое сито с диаметром пор 1 мм. Измельченную биомассу переносили в помещенный в ледяную баню стакан и добавляли охлажденный 0.1 М фосфатный буфер (pH 7.0), содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина (Serva, Германия), в соотношении 1:5 (объем биомассы : объем буфера). Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе Волна USTD-0.63/22 (U-Sonic, Россия). Ультразвуковую обработку проводили трижды по 10 с интервалами 1 мин, после чего гомогенат центрифугировали при 40000 g в течение 30 мин при 4°C на центрифуге Avanti® J-E (Beckman-Coulter, США). Полученный супернатант («холодный» экстракт), содержащий ферменты и компоненты люминесцентной реакции, отбирали и использовали для исследований.

Водный экстракт, содержащий стимулятор свечения базидиомицета *N. nambi in vivo*, получа-

ли изложенным нами ранее способом [22]. Отмытые деионизированной водой пеллеты мицелия помещали в свежий объем деионизированной воды, содержащей  $\beta$ -глюкозидазу (Serva, Германия) в концентрации 0.5 МЕ/мл, и инкубировали при 25°C в течение 24 ч при медленном перемешивании со скоростью 80 об./мин на шейкере OS-10. После инкубации жидкую часть (водный экстракт) отделяли от биомассы фильтрацией через бумажный фильтр. Разделение высоко- и низкомолекулярных компонентов экстракта проводили ультрафильтрацией через мембрану с пределом исключения 10 кДа (Merk Millipore, Германия). Для более полного отделения низкомолекулярных соединений от высокомолекулярных компонентов при ультрафильтрации экстракта в нем трижды заменяли деионизированную воду, каждый раз собирая подмембранные фильтраты. После диализа содержащие низкомолекулярные компоненты (в том числе стимулятор свечения) подмембранные фильтраты объединяли и концентрировали на роторном испарителе Rotavapor R-215 (Buchi, Швейцария). Полученный концентрат использовали в экспериментах.

Влияние изучаемых веществ (кофейной кислоты (Sigma, США), гиспидина (Sigma-Aldrich, США) и низкомолекулярного стимулятора) на грибное свечение оценивали в экспериментах *in vivo* (на пеллетах мицелия *N. nambii*) и *in vitro* (с использованием ферментной люминесцентной системы, выделенной из биомассы мицелия *N. nambii*). Для проверки функциональной активности ферментов выделенной люминесцентной системы использовали НАДФН (Sigma-Aldrich, США) и коммерческий гиспидин высокой степени чистоты (Sigma-Aldrich). Водный раствор гиспидина готовили *in situ* последовательными разведениями деионизированной водой исходного раствора гиспидина, приготовленного в метаноле (Sigma, США). Световую эмиссию содержащейся в образцах «холодного» экстракта ферментной люминесцентной системы активировали последовательными добавками приготовленных *in situ* водных растворов НАДФН и гиспидина. Образцы «холодных» экстрактов с высоким уровнем люминесцентной активности лиофильно высушивали (лиофильная сушилка ЛС-500, Россия) и хранили сухие препараты при температуре -30°C (морозильник MDF-U333, Sanyo Electric Co., Ltd., Япония) до момента использования. Было показано, что ферменты люминесцентных систем высших грибов проявляют высокую активность после хранения сухих «холодных» экстрактов в течение трех лет [17]. Для исследований высушенные препараты растворяли в деионизированной воде и использовали в экспериментах.

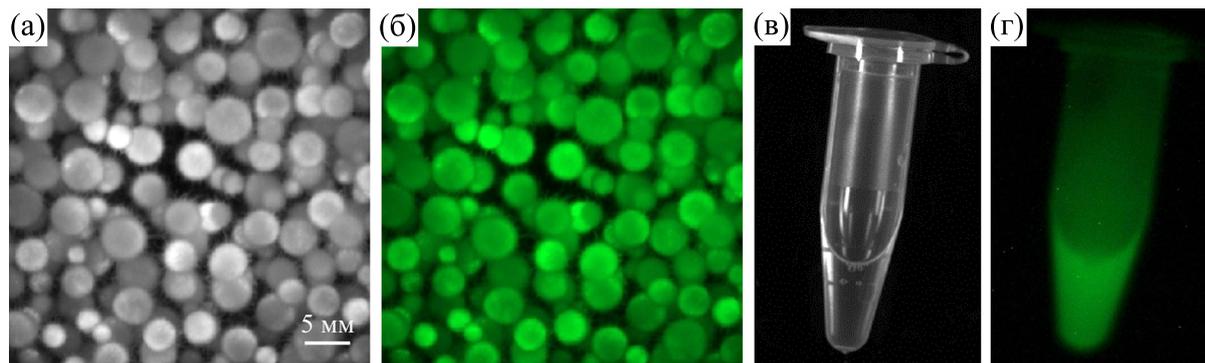
В исследованиях *in vivo* влияние изучаемых веществ на свечение пеллет мицелия *N. nambii* оценивали следующим образом. Индивидуальные

пеллеты (средний диаметр 5 мм) помещали в прозрачные пластиковые пробирки объемом 1.5 мл (Axygen Scientific, Inc., США), содержащие 300 мкл деионизированной воды. Пробирки устанавливали в измерительную камеру люминометра (GloMax<sup>®</sup> 20/20, Promega BioSystems Sunnyvale, Inc., США) и регистрировали исходный уровень свечения пеллет. После этого в образцы аккуратно (без перемешивания) вносили 5 мкл водных растворов изучаемых веществ (в использованных водных растворах реагентов концентрация кофейной кислоты составляла от 0.035 до 3.5 мМ, концентрация гиспидина – 33 мкМ) и вновь регистрировали интенсивность и динамику световой эмиссии пеллет.

В экспериментах *in vitro* эффекты изучаемых веществ на ферментную люминесцентную систему, выделенную из базидиомицета *N. nambii*, оценивали следующим образом. Прозрачные пробирки, содержащие 50 мкл препарата системы, устанавливали в люминометр GloMax<sup>®</sup> 20/20 и регистрировали начальный уровень световой эмиссии. Затем к препарату добавляли 5 мкл раствора 10 мМ НАДФН, приготовленного *in situ* в деионизированной воде, и повторно регистрировали интенсивность и динамику свечения. Световые сигналы, регистрируемые после добавки НАДФН, с одной стороны, указывают на наличие в тестируемых препаратах люминесцентной системы гриба *N. nambii* эндогенного гиспидина, который утилизируется в ходе реакции светоизлучения, с другой – являются показателем функциональной активности ферментов люминесцентной системы. После снижения инициированного НАДФН светового сигнала до стационарного уровня к препарату системы добавляли 5 мкл водных растворов изучаемых веществ (кофейная кислота, обнаруженный стимулятор или гиспидин) для оценки их влияния на свечение выделенной люминесцентной системы. В другом случае, после добавки к препарату системы растворов НАДФН и гиспидина и выхода светового сигнала на максимальный уровень, к препарату добавляли 5 мкл раствора кофейной кислоты или обнаруженного стимулятора, оценивая эффект данных соединений по изменению интенсивности и динамики свечения. Во всех рассматриваемых выше случаях тестирования люминесценции интенсивность и динамику световых сигналов регистрировали на люминометре GloMax<sup>®</sup> 20/20 в режиме одно измерение в секунду и выражали уровень световой эмиссии в относительных единицах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Технология культивирования базидиомицета *N. nambii* в погруженных условиях при постоян-



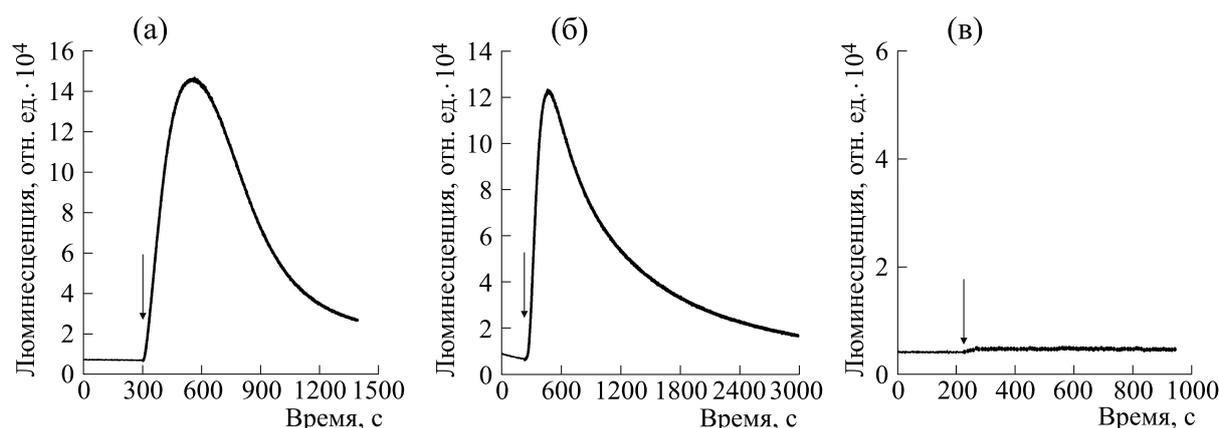
**Рис. 1.** Внешний вид и свечение пеллет мицелия базидиомицета *N. nambi* (а, б) и «холодного» экстракта, содержащего ферментную люминесцентную систему гриба, после добавления НАДФН, гиспидина и пероксида водорода (в, г). Изображения получены с помощью системы визуализации ChemiDoc™ XRS. Масштаб – 5 мм.

ном орбитальном перемешивании питательной среды позволяет выращивать мицелий гриба в виде шарообразных пеллет диаметром от 2 до 7 мм [28] (рис. 1а,б). Поверхность пеллет имеет выраженную шероховатую поверхность, образованную большим количеством поверхностных гиф. Получаемый в виде небольших шарообразных пеллет мицелий имеет определенные преимущества для исследования: пеллеты легко переносить из одной жидкой среды в другую и легко помещать в отдельную пробирку шпателем; манипуляции с пеллетами осуществляются при минимальном механическом воздействии на гриб, не нарушая его целостности. «Холодные» экстракты, содержащие компоненты люминесцентной реакции, получали с помощью механического разрушения биомассы мицелия и последующей обработки гомогенатов ультразвуком. На рис. 1в показан внешний вид осветленного с помощью центрифугирования «холодного» экстракта, который обладает регистрируемым свечением, уровень которого ожидаемо возрастает после добавления НАДФН и гиспидина. Следует сказать, что ранее нами был выявлен эффект повышения уровня световой эмиссии мицелия и выделенной из него ферментной люминесцентной системы при добавках пероксида водорода [29, 30]. Это позволило нам высказать в данных работах идею, что в механизм светоизлучения высших грибов могут вовлекаться ферментные системы (оксидазные ферменты лигнинолитического комплекса и система цитохрома P450), которые могут генерировать активные формы кислорода и с их участием катализировать окисление органических соединений с излучением квантов видимого света. Позднее в экспериментах *in vitro* мы установили, что при добавлении к «холодному» экстракту НАДФН, гиспидина и  $H_2O_2$  уровень его световой эмиссии может быть столь значительным, что наблюдается в темноте визуально и регистрируется системой визуализации Chemi-

Doc™ XRS (Bio-Rad, США) при работе в темновом режиме (рис. 1г).

В недавней работе [22] мы сообщали, что при выделении внеклеточных ферментов с помощью обработки пеллет мицелия *N. nambi*  $\beta$ -глюкозидазой в полученных водных экстрактах был обнаружен низкомолекулярный компонент, многократно увеличивающий интенсивность свечения гриба *in vivo*. Установление ряда свойств данного компонента и оценка его молекулярной массы с помощью гель-фильтрационной хроматографии позволили сделать вывод, что обнаруженный стимулятор свечения не является субстратом (или его предшественником) ферментной люминесцентной системы гриба *N. nambi* и не может являться кофейной кислотой. Выполненные в настоящей работе исследования с указанными соединениями выявили различия в их эффектах на биолюминесценцию светящегося базидиомицета *N. nambi in vivo* и *in vitro*.

В экспериментах *in vivo* было установлено, что обнаруженный стимулирующий свечение компонент при добавках к светящемуся мицелию *N. nambi* повышает уровень его световой эмиссии до полутора порядков и более (рис. 2а). Аналогичный эффект в экспериментах *in vivo* был получен также при использовании кофейной кислоты – при ее добавках к светящемуся мицелию *N. nambi* наблюдалось быстрое и значительное (на порядок и более) увеличение интенсивности световой эмиссии (рис. 2б). Как видно из представленных данных (рис. 2а,б), в обоих случаях повышение интенсивности светоизлучения пеллет регистрируется уже в течение первой минуты после добавления изучаемых соединений. В исследованиях было установлено, что увеличивающие свечение эффекты стимулятора и кофейной кислоты являются дозозависимыми и нарастают с увеличением количества добавляемых к пеллетам веществ. Это следует из анализа максимального уровня свечения пеллет при добавках разных количеств



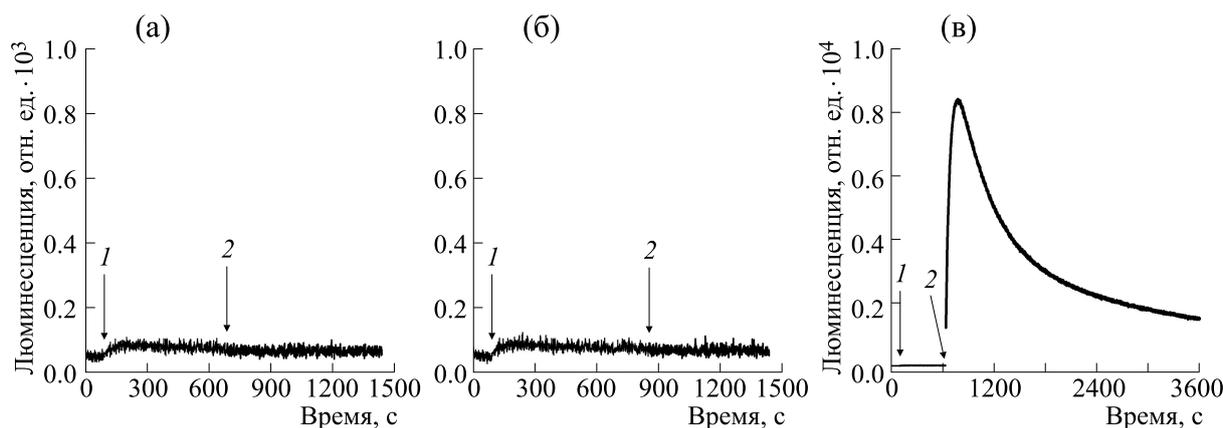
**Рис. 2.** Интенсивность и динамика люминесцентных сигналов, регистрируемых при добавках к пеллетам мицелия *N. nambi* водных растворов изучаемых соединений: (а) – низкомолекулярный стимулятор грибного свечения, (б) – кофейная кислота, (в) – гиспидин. Стрелками показаны моменты добавления реагентов к образцам пеллет.

данных веществ и площадей под кривыми регистрируемых при этом люминесцентных сигналов, отражающих суммарный квантовый выход. В то же время, в сравнительных экспериментах *in vivo* было показано, что добавки к пеллетам мицелия *N. nambi* водного раствора гиспидина не вызывали сколько-нибудь заметных изменений в уровнях их световой эмиссии (рис. 2в). По крайней мере, не было зарегистрировано каких-либо изменений в интенсивности свечения пеллет при добавках к образцам 5 мкл гиспидина с концентрацией 33 мкМ. При этом следует заметить, что гиспидин образуется в высших грибах из кофейной кислоты под действием гиспидин-синтазы и, являясь прекурсором люциферина, участвует в светоизлучении базидиомицетов, катализируемом ферментной системой «НАДФН-зависимая гидроксилаза – люцифераза» [18].

Представленные выше результаты сравнительных исследований *in vivo* (рис. 2а–в) позволили нам сделать следующие выводы. Отсутствие стимулирующего свечение эффекта гиспидина может свидетельствовать в пользу того, что на поверхности клеточной стенки базидиомицета *N. nambi* (или в структурных элементах клеточной стенки) отсутствуют ферменты, участвующие в трансформации гиспидина в люциферин и его окислении с излучением света. В то же время стимуляция грибного свечения кофейной кислотой и обнаруженным стимулятором позволяет нам высказать требующую дальнейшего изучения гипотезу, что генерация квантов видимого света в светоизлучающих высших грибах обеспечивается разными биохимическими путями с участием разных ферментов (или ферментных систем) и разных субстратов. Исходя из этого, мы предполагаем, что стимулирующее действие кофейной кислоты и обнаруженного стимулятора связано с наличием в грибе *N. nambi* иного биохимического

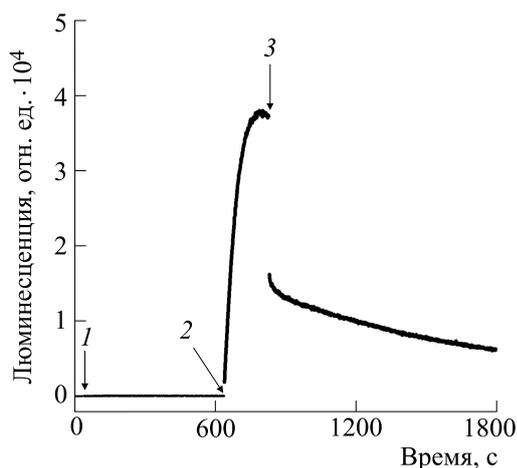
механизма светоизлучения. Такой механизм может обеспечиваться функционированием внеклеточных грибных оксидаз (прежде всего, оксидаз лигнинолитического комплекса), катализирующих окисление кофейной кислоты и стимулятора с излучением квантов видимого света. В пользу этого свидетельствует быстрая (в пределах одной минуты) кинетика развития люминесцентных сигналов, наблюдаемая при добавках стимулирующего компонента и кофейной кислоты к пеллетам мицелия *N. nambi*, которые могут взаимодействовать с внеклеточными грибными оксидазами, находящимися в поверхностных структурах клеточной стенки гриба. В дополнение следует отметить также, что полученные в исследованиях *in vivo* данные о стимуляции световой эмиссии мицелия *N. nambi* кофейной кислотой (рис. 2б) согласуются с результатами активации свечения живых пластинок шляпки гриба *M. chlorophos* этим веществом [31, 32]. Это позволяет нам с большой долей уверенности предполагать, что стимулирующий свечение *in vivo* эффект кофейной кислоты является общим для всех видов базидиальных грибов, обладающих биoluminesценцией.

В исследованиях *in vitro* с содержащими ферментную люминесцентную систему базидиомицета *N. nambi* «холодными» экстрактами нами были выявлены абсолютно противоположные эффекты изучаемых веществ на свечение по сравнению с эффектами, которые наблюдались в экспериментах *in vivo* с пеллетами грибного мицелия. Было установлено, что кофейная кислота и обнаруженный стимулятор свечения не вызывают увеличения интенсивности световой эмиссии «холодного» экстракта с предварительно добавленным в него НАДФН (рис. 3а,б). В то же время добавка гиспидина (как предшественника грибного люциферина) к содержащему НАДФН «хо-



**Рис. 3.** Интенсивность и динамика люминесцентных сигналов, регистрируемых при добавках к образцам «холодного» экстракта, содержащего ферментную люминесцентную систему гриба *N. nambi*, водных растворов изучаемых соединений: (а) – низкомолекулярный стимулятор грибного свечения, (б) – кофейная кислота, (в) – гиспидин. Стрелками показаны моменты добавления НАДФН (1) и изучаемого реагента (2) в экстракт.

лодному» экстракту ожидаемо приводила к развитию люминесцентного сигнала (рис. 3в). При этом в экспериментах *in vitro* было обнаружено, что добавки кофейной кислоты (или стимулирующего компонента) существенным образом подавляют интенсивность световых сигналов люминесцентной системы, активированной НАДФН и гиспидином (рис. 4). Было показано также, что ингибирующий свечение эффект является дозозависимым и нарастает от количества веществ, вносимых в пробу. Мы полагаем, что наблюдаемое ингибирование кофейной кислотой светоизлучающей реакции грибной люминес-



**Рис. 4.** Типичный эффект ингибирования кофейной кислотой (и низкомолекулярным стимулятором свечения) светового сигнала, генерируемого ферментной люминесцентной системой гриба *N. nambi*, активированной НАДФН и гиспидином. Стрелками показаны моменты добавления ингредиентов: 1 – НАДФН, 2 – гиспидин, 3 – кофейная кислота (или стимулятор).

центной системы может объясняться с точки зрения классической биохимии, поскольку согласуется с понятием об ингибировании фермента продуктом реакции по принципу обратной отрицательной связи. В нашем случае, такой механизм действия кофейной кислотой представляется вполне правомочным, поскольку она является конечным продуктом трансформации гиспидина в светоизлучении высших грибов [18].

С одной стороны, полученные в исследованиях *in vitro* результаты (рис. 3а–в) позволяют говорить, что в использованных нами экспериментальных условиях кофейная кислота не трансформируется в гиспидин под действием находящихся в «холодном» экстракте ферментов, а обнаруженный стимулирующий свечение компонент не является субстратом (или его предшественником) для выделенной люминесцентной системы. В то же время эти данные свидетельствуют в пользу высказанной нами выше гипотезы о разных биохимических механизмах генерации квантов видимого света в светоизлучающих базидиомицетах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований развивают и дополняют представления о механизмах светоизлучения высших грибов. Совокупность полученных данных указывает на наличие разных биохимических путей генерации квантов видимого света в обладающих биолюминесценцией базидиомицетах с участием разных ферментов (или ферментных систем) и разных субстратов. В свою очередь, это позволяет рассматривать регистрируемое (и визуально наблюдаемое) свечение высших грибов как интегральный показатель функционирования разных ферментных систем:

в частности, системы «НАДФН-зависимая гидроксилаза — люцифераза» с участием гиспидина и оксидазных ферментов лигнинолитического комплекса с участием кофейной кислоты и обнаруженного стимулятора грибного свечения *in vivo*.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chew A. L., Desjardin D. E., Tan Y. S., Musa M. Y., and Sabaratnam V. Bioluminescent fungi from Peninsular Malaysia — a taxonomic and phylogenetic overview. *Fungal Divers.*, **70**, 149–187 (2014). DOI: 10.1007/s13225-014-0302-9
- Mihail J. D. Bioluminescence patterns among North American *Armillaria* species. *Fungal Biol.*, **119**, 528–537 (2015). DOI: 10.1016/j.funbio.2015.02.004
- Desjardin D. E., Perry B. A., and Stevani C. V. New luminescent mycenoid fungi (Basidiomycota, Agaricales) from São Paulo State, Brazil. *Mycologia*, **108**, 1165–1174 (2016). DOI: 10.3852/16-077
- Oba Y. and Hosaka K. The luminous fungi of Japan. *Journal of Fungi*, **9** (6), 615 (2023). DOI: 10.3390/jof9060615
- Shimomura O. *Bioluminescence: chemical principles and methods* (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 2006).
- Desjardin D. E., Oliveira A. G., and Stevani C. V. Fungi bioluminescence revisited. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 170–182 (2008). DOI: 10.1039/B713328F
- Kobzeva T. V., Melnikov A. R., Karogodina T. Y., Zikirin S. B., Stass D. V., Molin Y. N., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Puzyr A. P., Burov A. A., Bondar V. S., and Gitelson J. I. Stimulation of luminescence of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* by ionizing radiation. *Luminescence*, **29** (7), 703–710 (2014). DOI: 10.1002/bio.2656
- Brandl H. Luminescent wood in coal and ore mines — A historical review. *Fungi Magazine*, **4** (2), 5–9 (2011). DOI: 10.5167/uzh-53631
- Vydryakova G. A., Van D. T., Shoukouhi P., Psurtseva N. V., and Bissett J. Intergenomic and intragenomic ITS sequence heterogeneity in *Neonothopanus nambi* (Agaricales) from Vietnam. *Mycology*, **3**, 89–99 (2012). DOI: 10.1080/21501203.2011.637085
- Oliveira A. G., Stevani C. V., Waldenmaier H. E., Viviani V., Emerson J. M., Loros J. J., and Dunlap J. C. Circadian control sheds light on fungal bioluminescence. *Curr. Biol.*, **25** (7), 964–968 (2015). DOI: 10.1016/j.cub.2015.02.021
- Desjardin D. E., Capelari M., and Stevani C. V. Bioluminescent *Mycena* species from São Paulo, Brazil. *Mycologia*, **99** (2), 317–331 (2007). DOI: 10.3852/mycologia.99.2.317
- Teranishi K. Localization of the bioluminescence system in the pileus of *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, **31** (2), 594–599 (2016). DOI: 10.1002/bio.3001
- Bondar V. S., Puzyr A. P., Purtov K. V., Petunin A. I., Burov A. E., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Shpak B. A., Tyaglik A. B., Shimomura O., and Gitelson J. I. Isolation of luminescence system from the luminescent fungus *Neonothopanus nambi*. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **455** (1), 56–58 (2014). DOI: 10.1134/S1607672914020045
- Purtov K. V., Petushkov V. N., Baranov M. S., Mineev K. S., Rodionova N. S., Kaskova Z. M., Tsarkova A. S., Petunin A. I., Bondar V. S., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Oba Y., Oba Y., Arseniev A. S., Lukyanov S., Gitelson J. I., and Yampolsky I. V. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. *Ang. Chem. Int. Ed.*, **54** (28), 8124–8128 (2015). DOI: 10.1002/anie.201501779
- Oba Y., Suzuki Y., Martins G. N. R., Carvalho R. P., Pereira T. A., Waldenmaier H. E., Kanie S., Naito M., Oliveira A. G., Dörr F. A., Pinto E., Yampolsky I. V., and Stevani C. V. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **16** (9), 1435–1440 (2017). DOI: 10.1039/c7pp00216e
- Kaskova Z. M., Dörr F. A., Petushkov V. N., Purtov K. V., Tsarkova A. S., Rodionova N. S., Mineev K. S., Guglya E. B., Kotlobay A., Baleeva N. S., Baranov M. S., Arseniev A. S., Gitelson J. I., Lukyanov S., Suzuki Y., Kanie S., Pinto E., Di Mascio P., Waldenmaier H. E., Pereira T. A., Carvalho R. P., Oliveira A. G., Oba Y., Bastos E. L., Stevani C. V., and Yampolsky I. V. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Sci. Adv.*, **3** (4), e1602847 (2017). DOI: 10.1126/sciadv.1602847
- Puzyr A. P., Medvedeva S. E., Artemenko K. S., and Bondar V. S. Luminescence of cold extracts from mycelium of luminous basidiomycetes during long-term storage. *Curr. Res. Env. Appl. Mycol.*, **7** (3), 227–235 (2017). DOI: 10.5943/cream/7/3/9
- Kotlobay A. A., Sarkisyan K. S., Mokrushina Y. A., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E. O., Markina N. M., Gonzalez Somermeyer L., Gorokhovatsky A. Y., Vvedensky A., Purtov K. V., Petushkov V. N., Rodionova N. S., Chepurnyh T. V., Fakhranurova L. I., Guglya E. B., Ziganshin R., Tsarkova A. S., Kaskova Z. M., Shender V., Abauov M., Abakumova T. O., Povolotskaya I. S., Eroshkin F. M., Zaisky A. G., Mishin A. S., Dolgov S. V., Mitiouchkina T. Y., Kopantzev E. P., Waldenmaier H. E., Oliveira A. G., Oba Y., Barsova E., Bogdanova E. A., Gabaldón T., Stevani C. V., Lukyanov S., Smirnov I. V., Gitelson J. I., Kondrashov F. A., and Yampolsky I. V. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115** (50), 12728–12732 (2018). DOI: 10.1073/pnas.1803615115

19. Teranishi K. Bioluminescence and chemiluminescence abilities of trans-3-hydroxyhispidin on the luminous fungus *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, **33** (7), 1235–1242 (2018). DOI: 10.1002/bio.3540
20. Puzyr A. P., Burov A. E., Medvedeva S. E., Burova O. G., and Bondar V. S. Two forms of substrate for the bioluminescent reaction in three species of basidiomycetes. *Mycology*, **10** (2), 84–91 (2019). DOI: 10.1080/21501203.2019.1583688
21. Garcia-Iriepa C., Losantos R., Fernandez-Martinez D., Sampedro D., and Navizet I. Fungal Light Emitter: Understanding Its Chemical Nature and pH-Dependent Emission in Water Solution. *J. Org. Chem.*, **85** (8), 5503–5510 (2020). DOI: 10.1021/acs.joc.0c00246
22. Ronzhin N. O., Posokhina E. D., Mogilnaya O. A., and Bondar V. S. Finding the Light Emission Stimulator of *Neonothopanus nambi* Basidiomycete and Studying Its Properties. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **503**, 80–84 (2022). DOI: 10.1134/S1607672922020120
23. Airth R. L. and McElroy W. D. Light emission from extracts of luminous fungi. *J. Bacteriol.*, **77**, 249–250 (1959). DOI: 10.1128/jb.77.2.249-250.1959
24. Airth R. L. and Foerster G. E. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 567–573 (1962). DOI: 10.1016/0003-9861(62)90124-8
25. Airth R. L. and Foerster G. E. Enzymes Associated with the Bioluminescence of *Panus stipticus* luminescens and *Panus stipticus* non-luminescens. *J. Bacteriol.*, **88**, 1372–1379 (1964). DOI: 10.1128/jb.88.5.1372-1379.1964
26. Oliveira A. G. and Stevani C. V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **8**, 1416–1421 (2009). DOI: 10.1039/B908982A
27. Oliveira A. G., Desjardin D. E., Perry B. A., and Stevani C. V. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11** (5), 848–852 (2012). DOI: 10.1039/c2pp25032b
28. Mogilnaya O. A., Ronzhin N. O., and Bondar V. S. Estimating levels of light emission and extracellular peroxidase activity of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* treated with  $\beta$ -glucosidase. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.*, **8** (1), 75–85 (2018). DOI: 10.5943/cream/8/1/6
29. Bondar V. S., Shimomura O., and Gitelson J. I. Luminescence of Higher Mushrooms. *J. Sib. Fed. Univ. Biology*, **5** (4), 331–351 (2012). DOI: 10.17516/1997-1389-0127
30. Bondar V. S., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Tyulkova N. A., Tyaglik A. B., Shpak B. A., and Gitelson J. I. On the mechanism of luminescence of the fungus *Neonothopanus nambi*. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **449**, 80–83 (2013). DOI: 10.1134/S1607672913020075
31. Teranishi K. Second bioluminescence-activating component in the luminous fungus *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, **32** (2), 182–189 (2017). DOI: 10.1002/bio.3165
32. Teranishi K. A combination of NADHP and hispidin is not essential for bioluminescence in luminous fungal living gills of *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, **32** (5), 866–872 (2017). DOI: 10.1002/bio.3265

## Effects of Caffeic Acid, Hispidin and the Discovered Stimulating Component on Luminescence of Mycelium and a Luminescent System of Basidiomycete *Neonothopanus nambi*

N.O. Ronzhin\*, E.D. Posokhina\*, V.M. Le\*\*, O.A. Mogilnaya\*, Yu.V. Zakharova\*\*\*, A.S. Sukhikh\*\*, and V.S. Bondar\*

\*Institute of Biophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

\*\*Kemerovo State University, Krasnaya ul. 6, Kemerovo, 650000 Russia

\*\*\*Kemerovo State Medical University, ul. Voroshilova 22a, Kemerovo, 650056 Russia

*In vivo* studies have revealed that the addition of caffeic acid and a low-molecular-weight compound, a bioluminescence stimulator, discovered in our research, to the mycelium of the luminous fungus *Neonothopanus nambi* leads to a rapid and significant (by an order of magnitude or more) increase in the intensity of its light emission. It has been suggested that the observed effect of activation of fungal bioluminescence may be mediated by the oxidation of added substances by enzymes of the ligninolytic complex of basidiomycetes (in particular, peroxidases) with the emission of visible light quanta. Parallel *in vivo* experiments showed that additions of hispidin (a luciferin precursor in the luminous higher fungi) have no effect on the light emission intensity of the mycelium. At the same time, *in vitro* studies have reported that caffeic acid and the detected low-molecular luminescence stimulator do not affect the level of light emission of the enzyme luminescent system isolated from the *N. nambi* mycelium in the presence of NADPH and significantly suppress the emission reaction of the system activated by NADPH and hispidin. A set of data collected demonstrate that different biochemical pathways present in the luminous higher fungi and different enzymes (or enzyme systems) and different substrates are involved in generation of visible light quanta.

**Keywords:** luminous higher fungi, luminescent system, caffeic acid, hispidin, light emission stimulator, mechanism of fungal luminescence