

ЭКСТРАКЛЕТОЧНАЯ ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И СВЕТОВАЯ ЭМИССИЯ МИЦЕЛИЯ БАЗИДИОМИЦЕТА *Neonothopanus nambi* ПРИ ОБРАБОТКЕ β -ГЛЮКОЗИДАЗОЙ

© 2018 г. О.А. Могильная, Н.О. Ронжин, В.С. Бондарь

Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

E-mail: ol_mog@mail.ru

Поступила в редакцию 07.10.16 г.

После доработки 03.04.17 г.

Проведена сравнительная оценка уровня экстраклеточной пероксидазной активности и интенсивности световой эмиссии мицелия светящегося базидиомицета *Neonothopanus nambi* при обработке β -глюкозидазой. Под действием фермента происходит нарушение целостности клеточной оболочки гиф гриба, что сопровождается нарушением осмотического равновесия, частичной деструкцией мицелия и выходом его экстраклеточных пероксидаз в среду инкубации. При обработке ферментом наблюдается более ранний выход свечения мицелия на максимальный уровень. Высказаны предположения о возможных биохимических механизмах активации образования активных форм кислорода (прежде всего, пероксида водорода) в мицелии *Neonothopanus nambi* при обработке β -глюкозидазой.

Ключевые слова: базидиомицеты, β -глюкозидаза, клеточная стенка, люминесценция, пероксидаза.

Результаты изучения светящегося базидиомицета *Neonothopanus nambi* свидетельствуют об участии активных форм кислорода (АФК) и оксидазных ферментов в механизме грибного свечения [1–4]. Было установлено, что инкубация мицелия в деионизованной воде, механическое повреждение, действие ионизирующего излучения приводят к многократному усилению световой эмиссии [3,5,6]. В экспериментах с образцами ярко и тускло светящегося мицелия *N. nambi* была показана одинаковая направленность изменений интенсивности светоизлучения и уровня активности ферментов антиоксидантной защиты – пероксидаз и каталазы [7,8]. При этом в образцах яркосветящегося мицелия был выявлен более высокий уровень экстраклеточной пероксидазной активности по сравнению с уровнем этой активности в образцах тускло светящегося мицелия. Совокупность полученных данных позволила высказать предположение о наличии метаболической взаимосвязи между ферментами свечения базидиомицета *N. nambi* и ферментами антиоксидантной защиты, в частности пероксидазами (включая экстраклеточные пероксидазы) и каталазой, нейтра-

лизующими повреждающее действие на гриб активных радикалов кислорода.

Основные компоненты клеточной стенки высших грибов – хитин и β -D-глюкан, их масса может составлять от 30 до 80% сухого веса клеточной стенки. В меньшем количестве в состав клеточной стенки входят гликопротеины, липиды, белки и другие компоненты. Хитиновые цепи создают каркас, обладающий значительной прочностью на растяжение. Снаружи клеточная стенка покрыта полисахаридной капсулой, имеющей поры и также представляющей собой β -D-глюкан [9–14]. Аскомицеты и базидиомицеты показывают высокую степень варибельности в синтезируемых ими β -D-глюканах. Несмотря на то что структурной единицей является один вид сахара, D-глюкоза, разнообразие достигается за счет аномерных форм (α -/ β -), положений и последовательности глюкозидных связей вдоль полимерной цепи, степени ветвления полимера, его молекулярного веса [15,16]. У базидиомицетов доминирующим полимером экзополисахаридов оболочки гифы являются (1–3)/(1–6)- β -D-глюканы. Некоторые базидиомицеты синтезируют β -D-глюканы с (1–4)/(1–6)- или с (1–3)/(1–4)-связями в основных полисахаридных цепях [17–19]. Разветвленные глюканы создают гелеобразную сеть во внешней оболоч-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, БГл – β -глюкозидаза.

ке гифы и межклеточном пространстве. Эта сеть удерживает воду, которая необходима для функционирования иммобилизованных здесь ферментов, в частности грибных пероксидаз [9,14,20]. Фермент класса гидролаз β -глюкозидаза (БГл) катализирует гидролиз концевых остатков в β -D-глюканах с освобождением молекул глюкозы. БГл обнаруживается у низших и высших грибов, а также у растений [21].

Цель работы – оценить экстраклеточную пероксидазную активность и световую эмиссию мицелия *N. nambii* при воздействии БГл на клеточную оболочку гиф гриба.

МЕТОДИКА

Культуры. В работе использованы штаммы светящегося базидиомицета *N. nambii* ИБСО 2307 и ИБСО 3293 из Коллекции микроорганизмов (ССИБСО 836) ИБФ СО РАН.

Питательные среды. При культивировании гриба использованы среда КС (200 г картофельного экстракта, 20 г сахарозы, 1 л дистиллированной воды) для выращивания штамма ИБСО 2307 и среда УМ (3 г дрожжевого экстракта, 3 г солодового экстракта, 5 г пептона, 10 г глюкозы, 1 л дистиллированной воды) для выращивания штамма ИБСО 3293.

Методы. Технология глубинного выращивания биомассы грибного мицелия в виде отдельных шарообразных пеллет описана нами ранее [5,7,8]. Уровень свечения пеллет измеряли на люминиметре Glomax 20/20 (Promega, США), калиброванном по радиоактивному стандарту Гастингса–Вебера [22] (одна люминесцентная единица составляет $2,7 \cdot 10^3$ фотонов в секунду). После измерения свечения пеллеты высушивали в роторном вакуумном концентраторе Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия) при 45°C в течение 1,5 ч для определения сухого веса. Величину удельной люминесцентной активности мицелия рассчитывали из отношения интенсивности световой эмиссии образца к его сухому весу.

Концентрацию глюкозы в культуральной среде в процессе выращивания мицелия оценивали глюкозооксидазным методом с использованием набора ферментов для определения глюкозы («Диакон ДС», Россия). Перед измерениями культуральную среду разводили деионизованной водой (Milli-Q system, Millipore, США).

Для ферментативной обработки клеточной оболочки гиф гриба использовали БГл из сладкого миндаля («Serva», Германия) (ЕС 3.2.1.21), растворенную в 10 мМ фосфатном буфере (рН 6,0). Для экспериментов образцы мицелия

готовили следующим образом. Выросшие пеллеты мицелия извлекали из питательной среды, помещали в деионизованную воду и проводили их отмывку при комнатной температуре (25°C) в течение нескольких суток со сменой объема воды два раза в сутки. Через равные промежутки времени (каждые сутки) часть пеллет отбирали для исследований. Пеллеты помещали в деионизованную воду, содержащую БГл (0,5–1,0 МЕ/мл), и инкубировали при 25°C в течение 3 ч при постоянном медленном перемешивании со скоростью 80 об/мин на шейкере OS-10 (Biosan, Латвия). Контрольные образцы мицелия инкубировали в деионизованной воде в таких же условиях без добавления фермента. После этого измеряли интенсивность светоизлучения пеллет и оценивали уровень их экстраклеточной пероксидазной активности с помощью реакции окислительного азосочетания [23]. Для этого по три пеллеты одинакового размера извлекали из инкубационной среды и помещали в пробирки с 1 мл реакционной смеси, содержащей фенол и 4-аминоантипирин в концентрациях 0,56 мг/мл и 0,1 мг/мл соответственно. Пробы выдерживали при комнатной температуре (24 – 25°C) в течение 1 ч. После этого жидкую часть проб отбирали и оценивали в них количество образовавшегося цветного продукта реакции (хинонимин) на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) по величине оптической плотности при длине волны 506 нм. Начальные уровни световой эмиссии и активности экстраклеточных пероксидаз мицелия оценивали следующим образом. Полученные после выращивания пеллеты извлекали из питательной среды и сразу инкубировали в деионизованной воде в течение 3 ч без (контроль) и с добавлением БГл (опыт). После этого измеряли интенсивность свечения пеллет и определяли уровень их экстраклеточной пероксидазной активности, как это изложено выше. В экспериментах дополнительно оценивали наличие пероксидазной активности в средах инкубации, из которых извлекали пеллеты. Для этого в образцы сред объемом 1 мл добавляли фенол и 4-аминоантипирин в указанных выше концентрациях и 10 мкл пероксида водорода (финальная концентрация в пробе – 8,8 мМ). Через 1 ч экспозиции проб при 24 – 25°C в них спектрофотометрически (см. выше) оценивали количество образовавшегося цветного продукта реакции.

Микроскопические исследования мицелия проводили с помощью светового микроскопа AxioImager M2 (Carl Zeiss, Германия). Для электронно-микроскопических исследований мицелия использовали стандартную методику подготовки препаратов для получения ультратон-

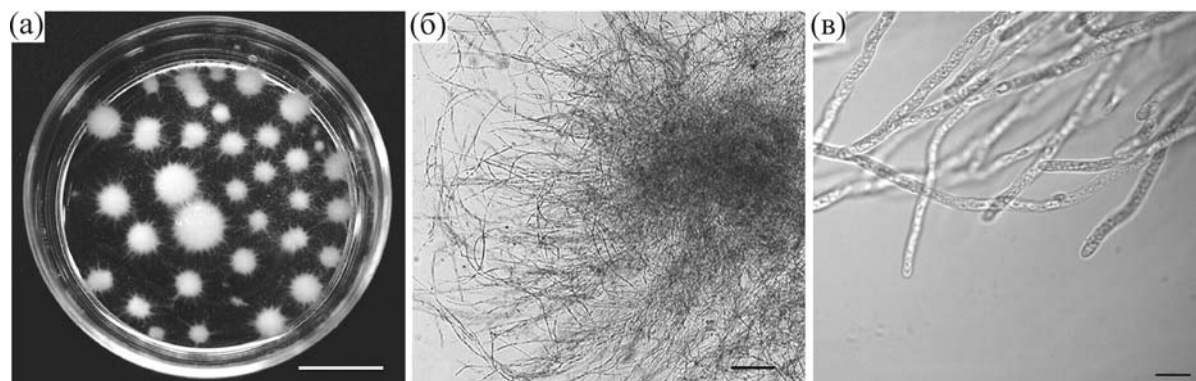


Рис. 1. Изображения пеллет мицелия *N. nambi* с ореолом гиф и плотной сердцевиной в отраженном (а) и проходящем (б) свете. Апикальные концы гиф на периферии пеллеты (в). Масштабная линейка: 10 мм (а), 100 мкм (б), 10 мкм (в).

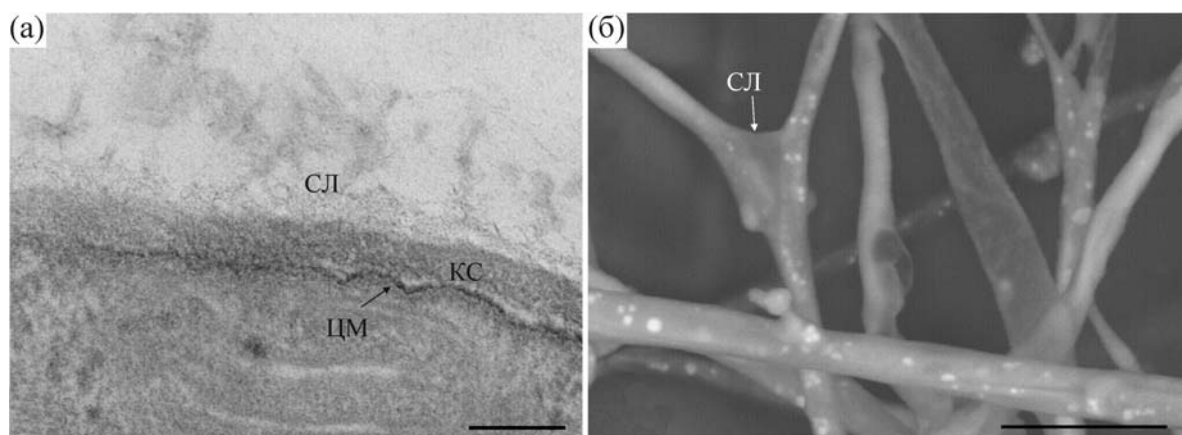


Рис. 2. (а) – Строение клеточной стенки и слизистой капсулы грибной гифы *N. nambi* на ультратонком срезе; (б) – гифы гриба, объединенные слизистой оболочкой, при просмотре в сканирующем микроскопе. Обозначения: КС – клеточная стенка, СЛ – слизистая капсула, ЦМ – цитоплазматическая мембрана. Масштабная линейка: 100 нм (а) и 10 мкм (б).

ких срезов. Срезы просматривали на электронном микроскопе NT770 (Hitachi, Япония) в Красноярском региональном центре коллективного пользования СО РАН. Для исследования в сканирующем режиме мицелий фиксировали в парах 4%-го водного раствора OsO_4 в течение 1 ч и просматривали на растровом электронном микроскопе ТМ 1000 (Hitachi, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При погруженном культивировании гриба с постоянным орбитальным перемешиванием мицелий *N. nambi* растет в виде белых (штамм 2307) или светло-кремовых (штамм 3293) пеллет диаметром 2–7 мм (рис. 1). Пеллеты имеют правильную округлую форму с поверхностным ореолом из пучков гиф, простирающихся на расстояние до нескольких миллиметров. При микроскопии было выявлено, что внутренняя

часть пеллет мицелия довольно плотная и состоит из переплетенных гиф и межклеточного вещества.

На ультратонких срезах пеллет клеточная стенка гиф имеет двух- или многослойное строение, к цитоплазматической мембране прилегает более плотный слой. Снаружи клеточной стенки гифы гриба покрыты слизистой капсулой, которая визуализируется как более рыхлый, в отличие от клеточной стенки, сетчатый слой (рис. 2). Слизистая капсула может объединять несколько гиф.

Было показано, что оба изучаемых штамма *N. nambi* при глубинном культивировании быстро растут на использованных в работе питательных средах с глюкозой и за первые четверо суток роста мицелия происходит наибольшее ее потребление грибом. При дальнейшем культивировании штаммов концентрация глюкозы

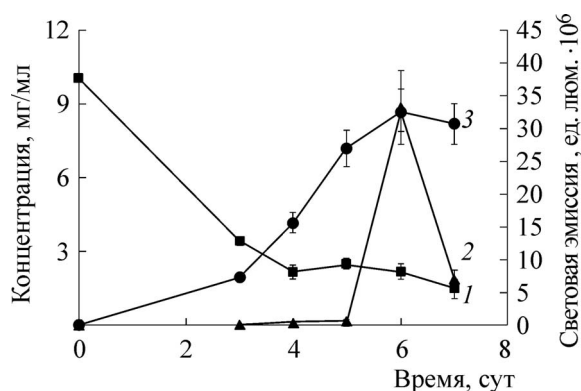


Рис. 3. Динамика изучаемых параметров при культивировании *N. nambii* в погруженных условиях с постоянным орбитальным перемешиванием: концентрация глюкозы в питательной среде (1), световая эмиссия пеллет мицелия (2) и прирост биомассы (3).

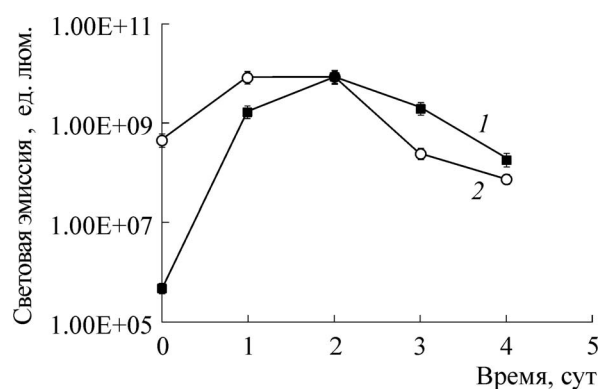


Рис. 4. Динамика световой эмиссии пеллет мицелия *N. nambii* при их длительной отмывке в деионизованной воде: без обработки (1) и после обработки (2) БГл. По оси абсцисс указано общее время отмывки мицелия в воде, нулевая точка соответствует дню изъятия пеллет из питательной среды.

в среде менялась незначительно (рис. 3). Из представленных данных видно, что световая эмиссия пеллет начинала возрастать во время экспоненциального роста биомассы и достигала максимального уровня к шестым суткам. С этого времени активные процессы роста грибного мицелия замедлялись, прирост биомассы прекращался, интенсивность свечения мицелия снижалась. Следует отметить, что при культивировании гриба *N. nambii* в погруженных условиях изменения исследуемых параметров (потребление глюкозы, интенсивность свечения и рост биомассы) в значительной степени совпадают с изменениями аналогичных параметров при культивировании светящихся бактерий в жидкой питательной среде [24].

Поскольку в дальнейших экспериментах с двумя штаммами базидиомицета *N. nambii* (ИБСО 2307 и ИБСО 3293) наблюдались схожие изменения изучаемых параметров, при описании полученных результатов мы не конкретизируем номер штамма. Для экспериментов пеллеты *N. nambii* брали из питательной среды на шестые сутки культивирования. Как показано выше (рис. 3), в это время наблюдался переход на стационарную стадию роста мицелия гриба и регистрировался максимальный уровень свечения пеллет при погруженном культивировании.

Было показано, что длительная (1–3 суток) отмывка пеллет мицелия *N. nambii* в деионизованной воде сопровождается усилением его свечения (рис. 4), что согласуется с результатами наших предыдущих исследований данного гриба [3,5,7,8]. Установлено, что при отмывании пеллет в воде в течение трех суток явные деструктивные изменения мицелия не наблюда-

лись. При микроскопических исследованиях не было выявлено заметных изменений внешнего вида и формы грибных гиф, в том числе находящихся на периферии пеллет и контактирующих с внешней средой (деионизованная вода). Сохранение морфологической целостности гиф при длительной экспозиции в гипоосмотических условиях обеспечивается упругостью их клеточной стенки и, как следствие, балансом осмотического давления. Следует сказать, что эластичность и динамичность клеточной стенки при осмотическом стрессе, когда хитин-глюкановый слой сжимается и разжимается в течение короткого промежутка времени, были продемонстрированы у дрожжей [25].

После трехчасовой инкубации пеллет *N. nambii* в деионизованной воде с добавлением БГл в них наблюдались явные морфологические изменения и отчетливые признаки осмотического шока – фрагментация слизистого слоя на поверхности гиф, гифы теряли форму, уплощались и ломались, цитоплазма коагулировала (рис. 5). Кроме того, нарушалась целостность межклеточного матрикса, что выражалось в потере ригидности и легком расплывании пеллет при надавливании покровным стеклом во время подготовки препаратов для световой микроскопии. Из приведенных выше фактов следует, что под действием БГл клеточная стенка со слизистой капсулой и межклеточный матрикс частично разрушились. В свою очередь, это привело к нарушению осмотического равновесия и, как следствие, деструктивным изменениям цитоплазмы в гифах.

Данные проведенных микроскопических исследований согласуются с результатами тестирования экстраклеточной пероксидазной актив-

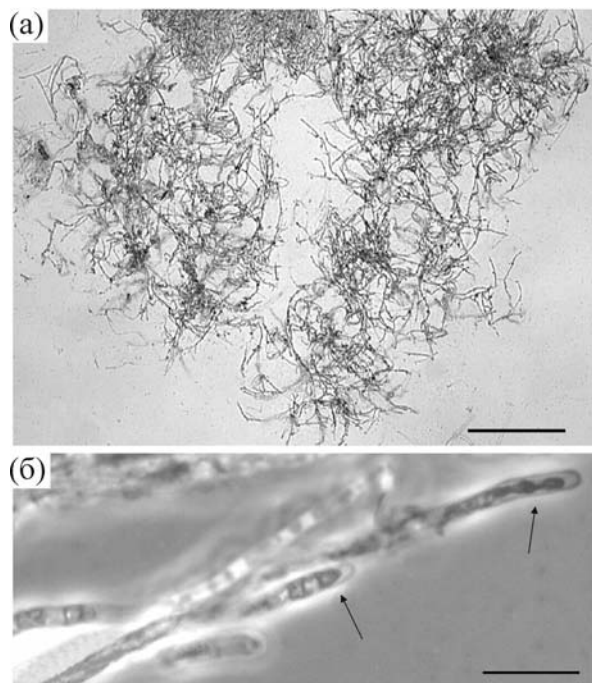


Рис. 5. Светооптические изображения деструктивных изменений мицелия *N. nambi* после обработки БГл: распад мицелия на периферии пеллеты (а); коагуляция цитоплазмы в гифах (б). Масштабная линейка: 100 мкм (а) и 10 мкм (б).

ности в контрольных и опытных образцах мицелия и средах их инкубации (рис. 6). Видно (рис. 6а), что у контрольных пеллет, взятых из питательной среды, после продолжительной (1–3 суток) отмывки деионизованной водой наблюдается постепенное повышение экстраклеточной пероксидазной активности – выход цветного продукта возрастает. Аналогичные результаты были получены нами ранее при исследовании динамики общей пероксидазной активности в экстрактах из мицелия *N. nambi* при его длительной отмывке водой [7,8]. Наблюдаемое повышение уровня экстраклеточной пероксидазной активности может свидетельствовать, что длительное пребывание мицелия *N. nambi* в гипоосмотических условиях не приводит к его значительной деструкции и серьезным нарушениям целостности клеточной стенки и слизистой капсулы гиф. Поэтому значительная часть экстраклеточных пероксидаз сохраняется в их полисахаридной оболочке. В то же время из данных рис. 6а следует, что у пеллет, обработанных БГл, наблюдается гораздо меньший прирост экстраклеточной пероксидазной активности. Это позволяет предполагать, что действие БГл вызывает в мицелии значительные деструктивные изменения, наиболее выраженные на фоне продолжительного ос-

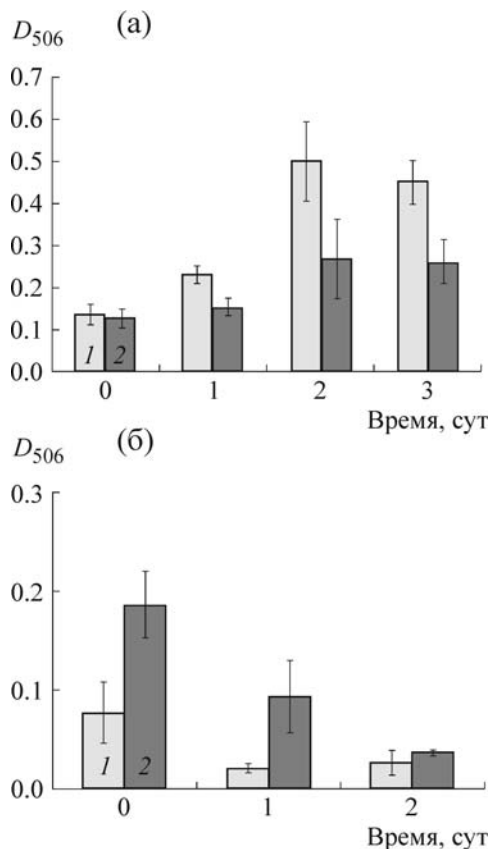


Рис. 6. Сравнительная оценка образования окрашенного продукта реакции окислительного азосочетания, что отражает уровень пероксидазной активности в пеллетах *N. nambi* (а) и в инкубационной среде (б). Обозначения: светлые столбики – без обработки, темные столбики – после обработки БГл. По оси абсцисс указано общее время отмывки мицелия в деионизованной воде, нулевая точка соответствует дню изъятия пеллет из питательной среды.

мотического стресса. При этом возможна утрата грибом части экстраклеточных пероксидаз за счет их выхода из нарушенной полисахаридной оболочки гиф в среду инкубации. В пользу этой версии свидетельствуют данные определения пероксидазной активности в средах инкубации контрольных и опытных пеллет (рис. 6б). Видно, что во всех инкубационных средах обнаруживается продукт реакции азосочетания, что указывает на наличие в них ферментов с пероксидазной активностью. Однако во всех средах, где экспозицию мицелия проводили в присутствии БГл, регистрируется значительно больше цветного продукта, что может указывать на большее содержание в них пероксидаз.

Высказанное предположение о причинах наблюдаемых различий уровня пероксидазной активности в средах инкубации контрольных и опытных образцов мицелия не противоречит

установленным ранее фактам при исследовании грибов. Известно, что абиотические стрессы (осмотический, температурный, гипоксия, pH) усиливают в клетках продукцию активных форм кислорода [26]. Для защиты от повреждающего действия АФК в базидиомицетах имеется многокомпонентная антиоксидантная система, включающая, в частности, разнообразные пероксидазы [27,28]. Грибные пероксидазы обнаруживаются в цитозоле, микросомах или других органеллах клетки, а также могут быть экстраклеточными. Экстраклеточные пероксидазы мицелия грибов локализованы в клеточной стенке и слизистой капсуле, окружающей гифы [9,29,30].

Исходя из этого можно предположить, что в нашем случае у контрольных образцов мицелия экстраклеточные пероксидазы могли диффундировать из гиф в водную среду из-за распада водорастворимой части их полисахаридной капсулы. У опытных образцов мицелия этот процесс мог усиливаться под действием БГл за счет дополнительного гидролиза β -D-глюканов во внешнем слизистом слое. Поэтому в водную среду могло диффундировать большее количество пероксидаз. В пользу этого свидетельствует выявление большего количества цветного продукта в воде инкубации опытных пеллет.

Как показали исследования (рис. 4), при длительной отмывке мицелия *N. nambi* в деионизованной воде с периодической обработкой части пеллет БГл динамика изменений световой эмиссии мицелия была практически такой же, как и в контроле. Однако из представленных данных видно, что в присутствии фермента выход на максимальный уровень свечения мицелия наблюдался раньше по сравнению с максимумом световой эмиссии контрольного мицелия. При этом у контрольных и опытных образцов мицелия наибольшие различия выявлялись в начальном уровне свечения, регистрируемом после того, как пеллеты были взяты из питательной среды и сразу инкубированы в деионизованной воде без фермента и в его присутствии. Установлено, что различия в начальных уровнях световой эмиссии контрольных и опытных образцов мицелия могли достигать нескольких порядков (рис. 4). Это указывает на то, что мицелий, взятый из питательной среды и помещенный в деионизованную воду в присутствии БГл, подвергался гораздо большему стрессовому воздействию за счет одновременного влияния двух факторов – гипоосмотического шока и фермента с гидролитическими свойствами. В этом случае можно предполагать гораздо больший уровень обра-

зования в мицелии АФК. Следует сказать, что в ходе длительной отмывки пеллет в воде с периодической инкубацией части из них в присутствии БГл регистрируемые уровни световой эмиссии контрольных и опытных образцов мицелия в значительной степени нивелировались и различались только в несколько раз (рис. 4).

Повышение уровня АФК (прежде всего H_2O_2) в мицелии при его обработке БГл может быть опосредовано следующими биохимическими процессами. БГл катализирует гидролиз β -D-глюканов клеточной стенки гиф и, тем самым, обеспечивает мицелий молекулами глюкозы. Выше говорилось, что образцы культивируемого мицелия брали для исследований при переходе гриба в стационарную стадию роста, когда содержание глюкозы в питательной среде было минимальным. Известно [9,21,29,31], что при дефиците углерода в стационарной стадии роста грибов их собственные эндо- и экзоглюканазы и β -глюкозидазы начинают расщеплять слизистую полисахаридную капсулу с образованием молекул глюкозы. В это время окисляющие глюкозу ферменты (глюкозооксидаза и пиранозоксидаза) начинают диффундировать из цитоплазмы и обнаруживаются как в периплазме, так и в экстраклеточной слизистой капсуле. Таким путем грибные экстраклеточные пероксидазы постоянно обеспечиваются необходимым субстратом – перекисью водорода. С другой стороны, нарушение целостности клеточной оболочки гиф под действием БГл и развитие осмотического шока, приводящего к деструкции мицелия, можно рассматривать как действие повреждающего стрессового фактора. Общеизвестно, что такое воздействие на живые клетки запускает механизм генерации АФК. Например, уменьшение времени выхода на максимальный пик свободной и активированной хемилюминесценции белых клеток крови человека за счет активации образования АФК наблюдалось при повреждающем воздействии наночастиц алмаза [32]. Следует отметить, что изучение последовательности запуска и вклада каждого из рассмотренных выше механизмов активации образования АФК в мицелии базидиомицета *N. nambi* является предметом отдельного исследования.

Таким образом, совокупность полученных в работе данных позволяет высказать несколько общих суждений и выводов. На двух штаммах светящегося базидиомицета *N. nambi* показано, что обработка мицелия БГл приводит к нарушению клеточной стенки и слизистой капсулы грибных гиф, осмотическому дисбалансу и, как следствие, частичной деструкции клеток мицелия. Морфологические изменения и признаки

осмотического шока выявлены микроскопическими методами. В пользу повреждения клеточной оболочки гиф под действием БГл указывают также результаты сравнительной оценки экстраклеточной пероксидазной активности в мицелии и наличия пероксидазной активности в инкубационной среде. Изучение люминесценции контрольных и опытных образцов мицелия показало, что в обоих случаях динамика изменений световой эмиссии была одинаковой. Однако установлено, что при обработке мицелия ферментом наблюдается значительное сокращение времени выхода световой эмиссии на максимальный уровень, что может быть связано с активацией образования АФК, в частности, перекиси водорода. В то же время потеря грибом значительной части экстраклеточных пероксидаз при обработке ферментами будет снижать эффективность его системы антиоксидантной защиты. В этом случае повышение уровня свечения пеллет мицелия, по-видимому, является компенсаторной реакцией гриба, направленной на нейтрализацию образующихся в условиях стресса активных радикалов кислорода за счет реакции излучения.

Согласно гипотезе, сформулированной в середине прошлого века МкЭлроем и соавторами [33,34] и получившей развитие в ряде последующих работ других авторов [35–40], функцией свечения живых организмов является защита от повреждения активными радикалами кислорода. Результаты наших исследований светящихся базидиомицетов позволили в недавних работах [7,8] высказать аналогичную гипотезу, что светоизлучение высших грибов возникло и закрепилось в ходе эволюции как дополнительный механизм нейтрализации АФК (в частности, H_2O_2 и, возможно, иных пероксидных соединений). В этих работах высказывалось предположение о возможной общей метаболической основе функционирования грибной люминесцентной системы и ферментов антиоксидантной защиты (включая пероксидазы), нейтрализующих повреждающее действие АФК. Результаты, представленные в настоящей работе, свидетельствуют в пользу высказанной гипотезы и развивают представления о свечении высших грибов как дополнительном механизме антиоксидантной защиты от повреждения АФК.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке из средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № 0356-2016-0709) и Программы СО РАН № П.2 «Интеграция и развитие» (проект № 0356-2015-0103).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. С. Бондарь, А. П. Пузырь, К. В. Пуртов и др., Докл. РАН **438** (5), 505 (2011).
2. V. S. Bondar, O. Shimomura, and J. I. Gitelson, J. Siberian Federal University. Biology **5** (4), 331 (2012).
3. В. С. Бондарь, Э. К. Родичева, С. Е. Медведева и др., Докл. РАН **449** (2), 223 (2013).
4. В. С. Бондарь, А. П. Пузырь, К. В. Пуртов и др., Докл. РАН **455** (3), 346 (2014).
5. S. E. Medvedeva, K. S. Artemenko, A. A. Krivosheenko, et al., Mycosphere **5** (4), 565 (2014).
6. T. V. Kobzeva, A. R. Melnikov, T. Y. Karogodina, et al., Luminescence **29** (7), 703 (2014).
7. О. А. Могильная, Н. О. Ронжин, С. Е. Медведева и В. С. Бондарь, Прикл. биохимия и микробиология **51** (4), 395 (2015).
8. О. А. Mogilnaya, N. O. Ronzhin, and V. S. Bondar, Mycosphere **7** (4), 499 (2016).
9. K. Ruel and J.-P. Joseleau, Appl. Environ. Microbiol. **57**, 374 (1991).
10. S. M. Bowman and S. J. Free, BioEssays **28**, 799 (2006).
11. T. L. Doering, Annu. Rev. Microbiol. **63**, 223 (2009).
12. Д. А. Андриянова, Я. Э. Сергеева, Г. А. Кочкина и др., Прикл. биохимия и микробиология **47** (4), 448 (2011).
13. S. J. Free, Adv. Genetics **81**, 33 (2013).
14. J.-P. Latgé and A. Beauvais, Curr. Opin. Microbiol. **20**, 111 (2014).
15. A. Synytsya and M. Novak, Carbohydr. Polym. **92**, 792 (2013).
16. M. Osińska-Jaroszuk, A. Jarosz-Wilkolażka, J. Jaroszuk-Scisei, et al., World J. Microb. Biot. **31** (12), 1823 (2015).
17. Y. Liu and F. Wang, Carbohydr. Polym. **70**, 386 (2007).
18. I. Fraga, J. Coutinho, R. M. Bezerra, et al., Carbohydr. Polym. **111**, 936 (2014).
19. M. L. L. Silveira, F. R. Smiderle, F. Agostini, et al., Int. J. Biol. Macromol. **75**, 90 (2015).
20. J. M. Barrasa, A. Gutierrez, V. Escaso, et al., Appl. Environ. Microbiol. **64** (1), 325 (1998).
21. J. van den Brink and R. P. de Vries, Appl. Microbiol. Biotechnol. **91**, 1477 (2011).
22. J. W. Hastings and G. Weber, J. Opt. Soc. Am. **53**, 1410 (1963).
23. А. Н. Ерёмин, Т. В. Семашко и Р. В. Михайлова, Прикл. биохимия и микробиология **42**, 452 (2006).
24. И. И. Гительзон, Э. К. Родичева, С. Е. Медведева и др., *Светящиеся бактерии*, отв. ред. Е. Н. Кондратьева (Наука, Новосибирск, 1984).
25. I. V. Ene, L. A. Walker, M. Shrivane, et al., MBio **6** (4), e00986-15 (2015).
26. L. Tomanek, J. Exp. Biol. **218**, 1867 (2015).
27. Н. Н. Гесслер, А. А. Аверьянов и Т. А. Белозерская, Биохимия **72**, 1342 (2007).

28. C. De Castro, P. Del Valle, J. Rua, et al., *Fungal Biol.* **117** (4), 275 (2013).
29. G. Daniel, T. Nilsson, and B. Pettersson, *Appl. Environ. Microbiol.* **55** (4), 871 (1989).
30. M. Takano, N. Hayashi, M. Nakamura, and M. Yamaguchi, *J. Wood Sci.* **55**, 302 (2009).
31. K.-E. Eriksson, B. Pettersson, J. Volc, and V. Musilek, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 257 (1986).
32. А. П. Пузырь, Д. А. Нешумаев, С. В. Тарских и др., *Биофизика* **50** (1), 101 (2005).
33. W. D. McElroy and B. L. Strehler, *Arch. Biochem.* **22**, 420 (1949).
34. W. D. McElroy and H. H. Seliger, in *Light and Life*, Ed. by W. D. McElroy and B. Glass (Johns Hopkins Press, Baltimore, 1961), pp. 219–257.
35. H. Watanabe, T. Nagoshi, and H. Inaba, *Biochim. Biophys. Acta* **1141**, 297 (1993).
36. M. P. Barros and E. J. Bechara, *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 767 (1998).
37. H. Szpilewska, A. Czyz, and G. Wegrzyn, *Curr. Microbiol.* **47**, 379 (2003).
38. A. M. Katsev, G. Wegrzyn, and H. Szpilewska, *J. Basic Microbiol.* **44**, 178 (2004).
39. O. Shimomura, *Bioluminescence: chemical principles and methods* (World Scientific Publishing, Singapore, 2006).
40. S. Subbian, P. K. Mehta, S. L. G. Cirillo, and J. D. Cirillo, *BMC Microbiol.* **7** (4), 1 (2007).

Extracellular Peroxidase Activity and Light Emission in the Mycelium of Basidiomycete *Neonothopanus nambi* in the Presence of β -Glucosidase

O.A. Mogilnaya, N.O. Ronzhin, and V.S. Bondar

Institute of Biophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences", Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

A comparative evaluation of the level of extracellular peroxidase activity and the intensity of light emission in the mycelium of luminescent basidiomycete *Neonothopanus nambi* in the presence of β -glucosidase was performed. Enzyme activity induced damage to the hyphae of the fungus leading to osmotic excursions, partial degradations of the mycelium and release of extracellular peroxidases into the incubation medium. Luminescence of mycelium reached the maximum level faster in the presence of β -glucosidase. The assumptions concerning plausible biochemical mechanisms for stimulation of reactive oxygen species formation (firstly, hydrogen peroxide) in the mycelium of *Neonothopanus nambi* in the presence of β -glucosidase were made.

Keywords: basidiomycetes, β -glucosidase, cell wall, luminescence, peroxidase