

ЛЮМИНОФОРЫ СВЕТЯЩЕГОСЯ ГРИБА *Neonothopanus nambi*

© 2017 г. Ю.П. Зернов, Т.В. Кобзева, Т.Ю. Дранова, Д.В. Стась,
А.А. Алексеев, А.А. Нефедов*

Институт химической кинетики и горения СО РАН, 630090, Новосибирск, ул. Институтская, 3;

*Институт органической химии СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 9

E-mail: zernov.yu@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.05.16 г.

Представлены результаты выделения из мицелия светящегося гриба *Neonothopanus nambi* люминофоров. Показано, что в спектре флуоресценции исходных экстрактов, кроме пика в зеленой области с максимумом 520–530 нм, который соответствует максимуму излучения гриба *in vivo*, регистрируется дополнительный пик световой эмиссии, имеющий максимум в синей области. Люминофор, излучающий в синей области, представляет собой индивидуальное вещество с молекулярной массой 894 Да. Проведенные расчеты с учетом изотопного состава атомов позволили вывести несколько наиболее вероятных брутто-формул люминофора: $C_{52}H_{65}N_2O_{11}$, $C_{51}H_{65}N_4O_{10}$, $C_{53}H_{61}N_6O_7$, $C_{47}H_{65}N_4O_{13}$, $C_{46}H_{65}N_6O_{12}$. Получен образец, содержащий соединения желтого цвета, обладающие флуоресценцией в зеленой области спектра. Одним из его люминофоров, видимо, является рибофлавин либо его производные флавиномонуклеотид или флавинадениндинуклеотид.

Ключевые слова: люминофоры, светящиеся высшие грибы, *Neonothopanus nambi*, флуоресценция, масс-спектрометрия, рибофлавин или его производные.

Биолюминесценция широко распространена в живой природе [1]. Светиться могут бактерии, насекомые, черви, медузы, рыбы, грибы, и этот список можно продолжать. Для чего насекомые и глубоководные рыбы используют биолюминесценцию – вполне понятно. Роль биолюминесценции в жизни других представителей живой природы не столь очевидна. Для чего грибы используют явление биолюминесценции – непонятно, хотя существуют различные гипотезы (привлечение насекомых-переносчиков спор, ответ на стресс с участием активных форм кислорода и т.д.) [2,3]. Желание понять роль биолюминесценции в жизни грибов во многом и привлекает исследователей к этой проблеме.

Поскольку грибы представляют собой третье царство живой природы, эволюционно удаленное от двух остальных – растений и животных, можно ожидать, что биолюминесцентная система грибов может оказаться иной, нежели уже описанные биолюминесцентные системы бактерий и животных. Так, системы биолюминесценции бактерий и насекомых [1], несмотря на некоторую общность, тем не менее, имеют существенные различия. Можно ожидать, что и биолюминесцентная система грибов окажется своеобразной. В связи с этим возникает необходимость изучения биолюминесцентной системы грибов на молекулярном уровне.

Одним из первых шагов в этом направлении может стать выделение и установление молекулярной структуры люминофоров, входящих в состав люминесцирующих грибов.

Получение из биомассы светящихся высших грибов флуоресцентных соединений открывает перспективы исследования их свойств и возможного участия в механизмах грибного излучения.

Задача данной работы состояла в выделении из мицелия светящегося гриба *Neonothopanus nambi* люминофора (люминофоров) и изучении его свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Водные экстракты, содержащие люминофоры, получали из биомассы мицелия гриба *N. nambi*, выращенного по разработанной ранее технологии [4]. Для выделения использовали 8–10 г мицелия. Разрушение клеточных стенок и получение водных экстрактов проводили методом замораживания–оттаивания, как описано в работе [5]. Для удаления балластных белков водные экстракты прогревали в течение 5 мин на кипящей водяной бане, охлаждали, а образовавшийся осадок удаляли центрифугированием на микроцентрифуге (Eppendorf, Германия). Осаждение клеточной ДНК осуществляли эти-

ловым спиртом, доводя концентрацию этанола в экстракте до 70%, в присутствии 20 мМ $MgCl_2$, как описано в работе [6]. Дальнейшую очистку проводили с помощью гель-фильтрации на колонке (9 мм × 50 см) с сефадексом G-15 (Pharmacia, Швеция), уравновешенной дистиллированной водой. Элюирование осуществляли 50 мл дистиллированной воды, собирая фракции объемом 1,5 мл. Детекцию люминофоров проводили, измеряя уровень флуоресценции. Фракции, содержащие люминофор, объединяли и наносили на колонку (9 мм × 5 см) с DEAE-целлюлозой (Whatman, Англия), уравновешенную дистиллированной водой. Продукты с колонки вымывали 30 мл восходящего ступенчатого градиента NaCl (концентрация от 0 до 0,4 М). Фракции объемом 1 мл, содержащие люминофор, объединяли и подвергали дальнейшей очистке высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонке HiTrap Q FF объемом 1 мл (GE Healthcare Life Science, США). Фракционирование люминофора проводили методом ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Agilent 1100 (Agilent Tech., США) со спектрофотометрическим детектором. Условия разделения: подвижная фаза А – вода, подвижная фаза Б – 1 М раствор NaCl; градиент от 0 до 50% в течение 55 мин, скорость потока 0,3 мл/мин, детекция на 270 нм и измерение уровня флуоресценции во фракциях. Фракцию объемом 0,5 мл, содержащую люминофор, трижды экстрагировали 1,5 мл этилацетата и сконцентрировали упариванием на ротационном испарителе. Дополнительную очистку фракции осуществляли на колонке (6 мм × 8 см) с силикагелем МСКГ (Россия), уравновешенной гексаном. Далее колонку последовательно промывали 10 мл гексана, 10 мл 20% этилацетата в гексане и 10 мл 50% этилацетата в гексане. Собирали фракции объемом 1,5 мл. Фракции, содержащие люминофор, объединяли, концентрировали и использовали для измерения спектров флуоресценции и масс-спектрометрии.

Кроме этого, водные экстракты, содержащие люминофоры, подвергали экстракции равным объемом этилацетата. Получающуюся мутную этилацетатную фракцию центрифугировали на микроцентрифуге (Eppendorf, Германия). Прозрачный желтый супернатант упаривали досуха и растворяли в смеси 50% этилацетата : 50% гексана (в объемном отношении). При этом часть продуктов оставалась нерастворенной. Получившийся раствор люминофоров использовали для измерения спектров флуоресценции и экспериментов с облучением ртутной лампы.

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах 20% этилацетата : 80% гексана и 50% этилацетата : 50% гексана (в объемном отношении).

Наличие люминофоров в экстрактах регистрировали по флуоресценции при длинах волн возбуждения 375 и 450 нм, подобранных экспериментально. Для измерения флуоресценции использовали флуоресцентный спектрофотометр MPF-4 Fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Япония).

Масс-спектрометрию образца люминофора проводили с использованием газового хромато-масс-спектрометра высокого разрешения Agilent 7200 Accurate-Mass Q-TOF GC/MS (Agilent Tech., США) и масс-спектрометра высокого разрешения Bruker Daltonics MicroTOFQ (Bruker, США).

Для облучения образцов люминофоров светом в области 440–450 нм использовали ртутную лампу высокого давления ДРШ-500 с набором стеклянных фильтров (синего СС15 и желтого ЖС12, а также водного фильтра для отрезания теплового излучения).

В работе использовали: агар (Difco, США), NADPH (Serva, Германия), трис (Sigma, США), рибофлавин мононуклеотид (Россия), дитионит натрия ($Na_2S_2O_4$, х.ч.) (Россия). Остальные реактивы имели квалификацию ос.ч. или х.ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что повреждение клеточной стенки гриба в результате замораживания и последующего оттаивания приводит к необратимой потере биолюминесценции [4], т.е. разрушает сложную систему генерации электронного возбуждения и высвечивания его в виде кванта излучения. При этом сами эмиттеры люминесценции, вероятно, могут высвободиться и быть выделены в растворе. Поэтому на первом этапе нами был разработан метод тестирования люминофоров *in vitro* с помощью флуоресценции, который позволяет выявлять в грибных экстрактах соединения, способные к свечению при облучении их светом с различной длиной волны. В спектре флуоресценции исходных экстрактов, кроме пика в «зеленой» области с максимумом 520–530 нм, который соответствует максимуму излучения гриба *in vivo*, зарегистрирован дополнительный пик световой эмиссии, имеющий максимум в «синей» области [7]. На рис. 1 представлен спектр флуоресценции бесклеточного экстракта гриба *Neonothopanus nambi*. Используя спектры возбуждения исходных экстрактов, нами были подобраны длины

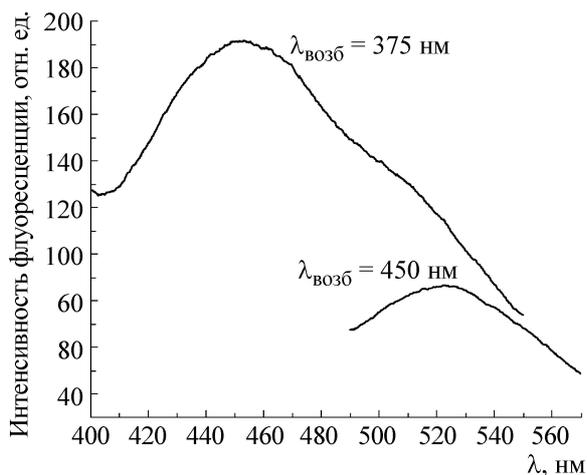


Рис. 1. Спектр флуоресценции бесклеточного экстракта гриба *Neonothopanus nambi*.

волн возбуждения люминофоров, которые позволяют получать максимальные сигналы в спектрах флуоресценции. Эти длины волн составили 375 и 450 нм.

Полученные результаты позволили перейти к следующей стадии работы. Были отработаны процедуры разрушения биомассы грибов, экстракции различных компонентов клеточного дебриса, осаждения клеточной ДНК, удаления балластных белков. Очистку проводили с помощью гель-фильтрации, колоночной анионообменной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. В ходе очистки были выявлены несколько фракций, содержащих люминофоры, которые имели различные спектры флуоресценции. Работа по выделению люминофоров проводилась как в водных растворах, так и в органических растворителях.

При проведении очистки на колонке с силикагелем был выделен хроматографически однородный люминофор (рис. 2), который при тонкослойной хроматографии в различных системах наблюдался в виде одного пятна. Раствор люминофора в хлороформе имел спектр флуоресценции с максимумами при 410 и 430 нм. Смещение длины волны возбуждения как в коротковолновую (355 нм), так и в длинноволновую (385 нм) область не приводит к смещению максимума спектра флуоресценции, а сказывается только на интенсивности флуоресценции. Это указывает на то, что выделенный люминофор, скорее всего, не является смесью люминофоров, а представляет собой индивидуальное вещество. В водных растворах спектр флуоресценции данного люминофора представляет собой широкий пик с максимумом в районе 450 нм.

Совокупность данных по хроматографической однородности, спектров флуоресценции и масс-спектрометрии данного образца, представленной на рис. 3, показывает, что изучаемый люминофор представляет собой индивидуальное вещество с молекулярной массой 894 Да. Для сравнения, молекулярные массы известных люминофоров грибов *Panellus stipticus* [1] и *Lampteromyces japonicus* [8] составляют 1286–1370 и 376 Да соответственно. Однако следует отметить, что люминофор *Lampteromyces japonicus*, который авторы работы [8] определили как рибофлавин, может находиться в форме флавиномононуклеотида с молекулярной массой 456 Да или в виде флавинаденидинуклеотида, имеющего молекулярную массу около 800 Да. Кроме того, недавно появилась публикация [9], авторы которой доказывают, что хиспидин с молекулярной массой 246 Да может служить

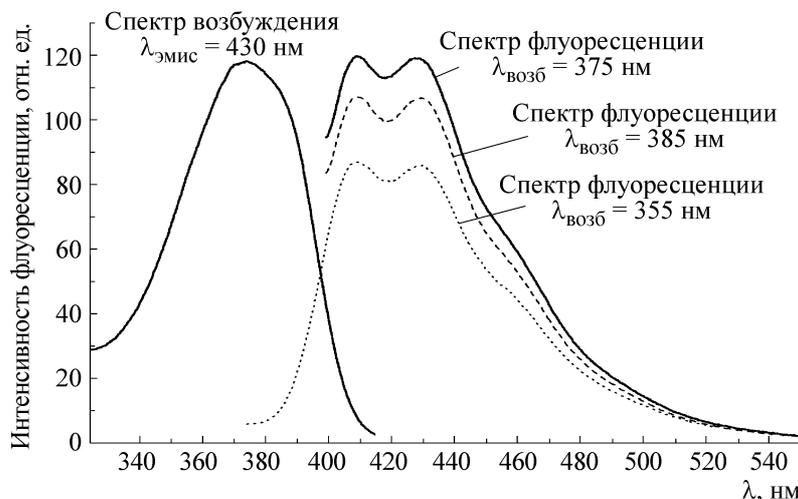


Рис. 2. Спектры возбуждения и флуоресценции выделенного люминофора, растворенного в хлороформе.

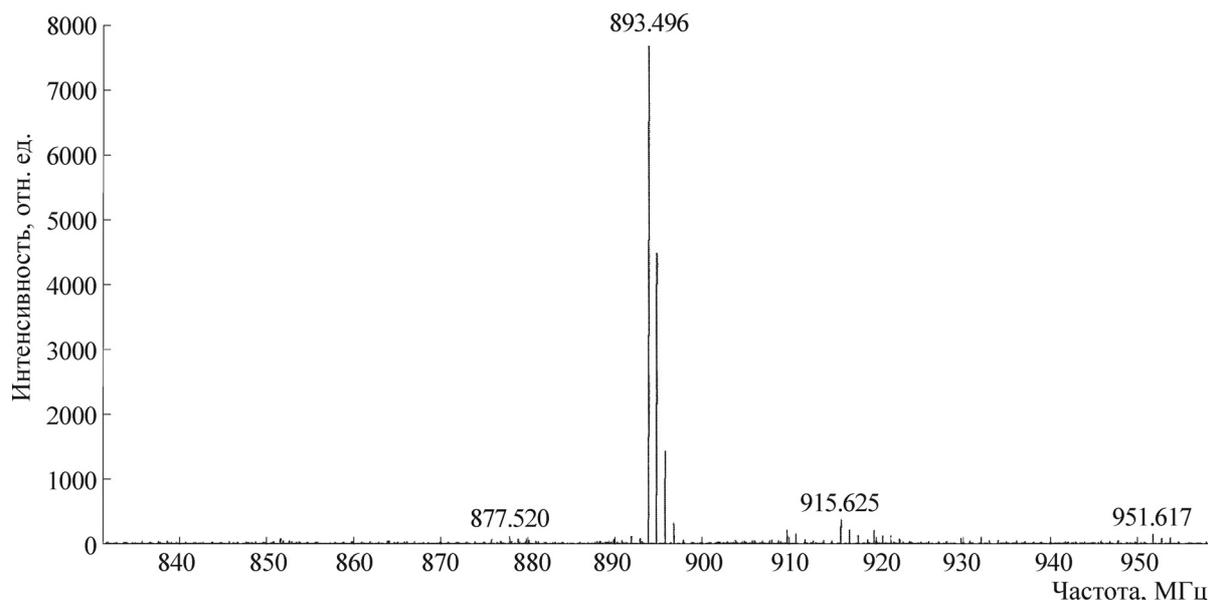


Рис. 3. Масс-спектр выделенного люминофора (отрицательно заряженные ионы).

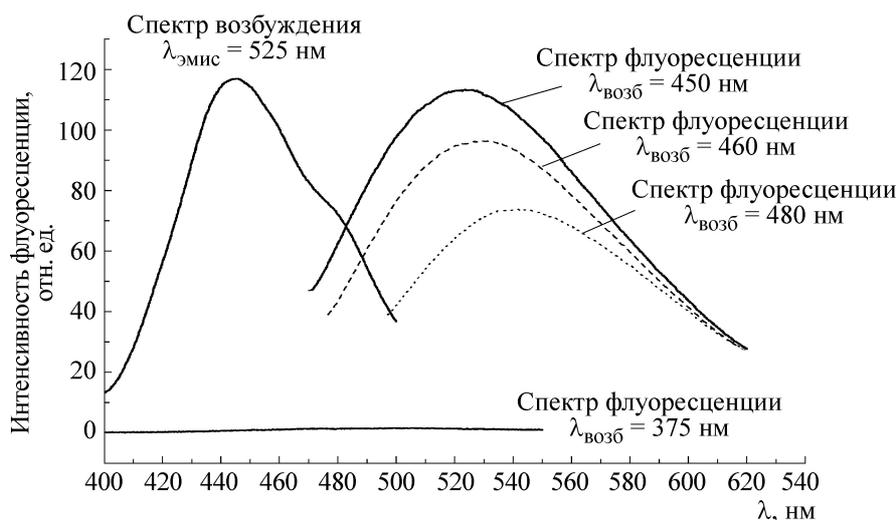


Рис. 4. Спектры возбуждения и флуоресценции люминофоров образца желтого цвета.

универсальным прекурсором в системе грибной биолюминесценции.

Расчеты, учитывающие наличие в молекуле природного изотопа C^{13} , позволяют оценить количество атомов углерода в молекуле люминофора на уровне 46–55. Проведенные расчеты с учетом изотопного состава других атомов указывают на наличие в молекуле люминофора атомов углерода, водорода, кислорода и азота и отсутствие атомов фосфора и серы. Наиболее вероятные брутто формулы люминофора следующие: $C_{52}H_{65}N_2O_{11}$, $C_{51}H_{65}N_4O_{10}$, $C_{53}H_{61}N_6O_7$, $C_{47}H_{65}N_4O_{13}$, $C_{46}H_{65}N_6O_{12}$.

При обработке грибных экстрактов этилацетатом дополнительно получен образец, содержащий соединения желтого цвета, обладающие флуоресценцией. Эти люминофоры не флуоресцируют при возбуждении на длине волны 375 нм, а возбуждение на длине волны 450 нм приводит к флуоресценции в зеленой области спектра с максимумом при 525 нм, т.е. в области, характерной для биолюминесценции живого гриба. На рис. 4 видно, что смещение длины волны возбуждения в длинноволновую область приводит к сдвигу максимума в спектрах флуоресценции. Это указывает на то, что

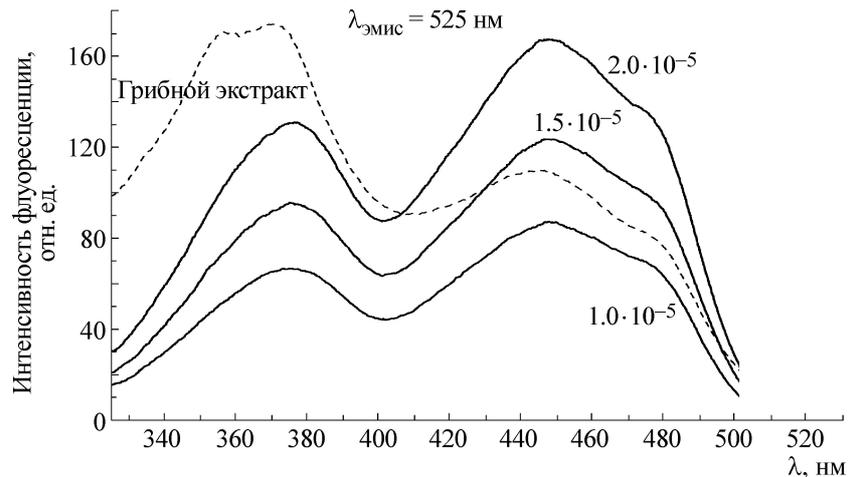


Рис. 5. Спектры возбуждения рибофлавина (при трех разных процентных концентрациях) и бесклеточного экстракта гриба *Neonothopanus nambi*.

мы имеем дело со смесью как минимум двух люминофоров, имеющих максимумы флуоресценции при 520 и 540 нм.

При работе с клеточными экстрактами гриба выяснилось, что при выдерживании последних при комнатной температуре наблюдается рост флуоресценции в «зеленой» области с выходом на плато ко вторым суткам. Удаление образующейся мути (наблюдаются процессы биодеградации) несколько уменьшает уровень флуоресценции, тем не менее, общий рост флуоресценции в области 525 нм оказывается трехкратным. Аналогичные эксперименты с субстратом (прокипяченный клеточный экстракт гриба) не показывают существенного роста уровня флуоресценции. Трехкратное увеличение флуоресценции не может быть объяснено ошибкой эксперимента или спектральными особенностями.

Полученные результаты позволили нам предположить, что рост флуоресценции связан с рибофлавином (или его производными – флавиномонуклеотидом или флавинадениндинуклеотидом), которые, будучи связанными с ферментами, могут существовать как в окисленной, так и в восстановленной форме [10]. Восстановленная форма рибофлавина не флуоресцирует, а по мере протекания окислительных процессов, происходящих в процессе биодеградации, происходит накопление окисленной формы. Рибофлавин и его производные могут присутствовать в грибах в достаточно больших количествах [11] и, кроме того, рассматриваются некоторыми авторами [8,12] в качестве участников системы грибной биолюминесценции, по аналогии с системой биолюминесценции бактерий, в которой рибофлавин является

непосредственным участником системы биолюминесценции [1].

Сопоставление спектров возбуждения рибофлавина и клеточного экстракта представлено на рис. 5. Видно, что общий вид спектров довольно похож, особенно в области 420–490 нм. Из литературы известно [13], что облучение рибофлавина светом в области 440–450 нм приводит к деградации молекулы рибофлавина с образованием люмихрома (при нейтральном и кислом рН) или люмифлавина (в щелочных условиях). Для подтверждения предположения о присутствии рибофлавина в клеточных экстрактах гриба *N. Nambi* был проведен фотолиз грибных экстрактов светом ртутной лампы. Для выбора условий фотолиза предварительно осуществили фотолиз водного раствора рибофлавина (рН 6,0) под действием света ртутной лампы с длиной волны 440 нм. Свет с этой длиной волны из спектра ртутной лампы вырезался комбинацией фильтров, как описано в материалах и методах. Из рис. 6 видно, что процесс фотолиза рибофлавина протекает количественно. Фотолиз грибных экстрактов в этих условиях, как в нейтральной среде, так и в щелочных условиях, протекает несколько медленнее, что, видимо, обусловлено поглощением части света ртутной лампы другими компонентами грибных экстрактов. При этом фотолиз и в том и в другом случаях проходит на 40% (рис. 7, 8). Таким образом, падение уровня флуоресценции на 40% в «зеленой» области (525 нм), видимо, обусловлено присутствием рибофлавина или его производных. Остальные 60% флуоресценции в этой области обусловлены другим или другими люминофорами, которые устойчивы к фотолизу. Кроме этого, практически не

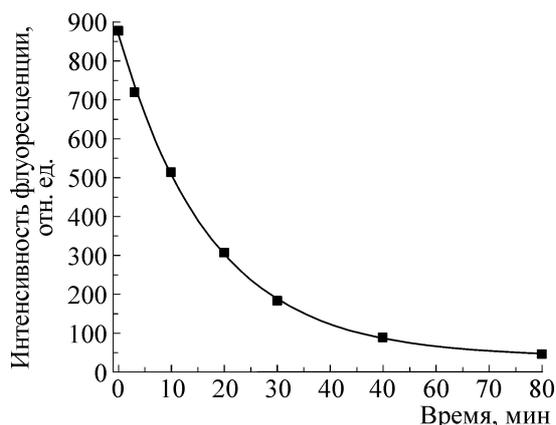


Рис. 6. Фотолиз водного раствора рибофлавина (рН 6,0) под действием света ртутной лампы (440 нм).

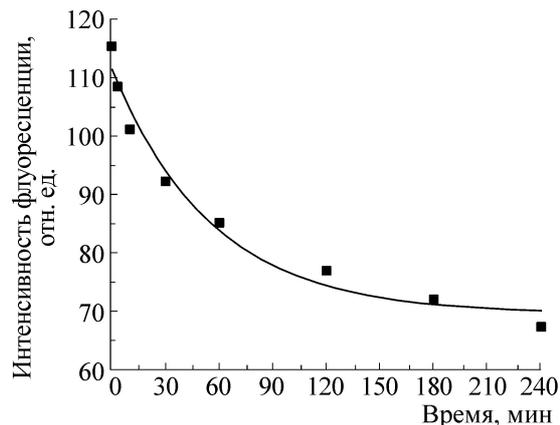


Рис. 8. Фотолиз грибного экстракта (рН 9,0) под действием света ртутной лампы (440 нм).

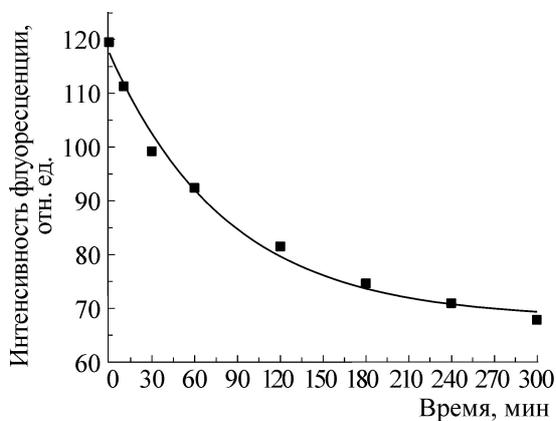


Рис. 7. Фотолиз грибного экстракта (рН 6,0) под действием света ртутной лампы (440 нм).

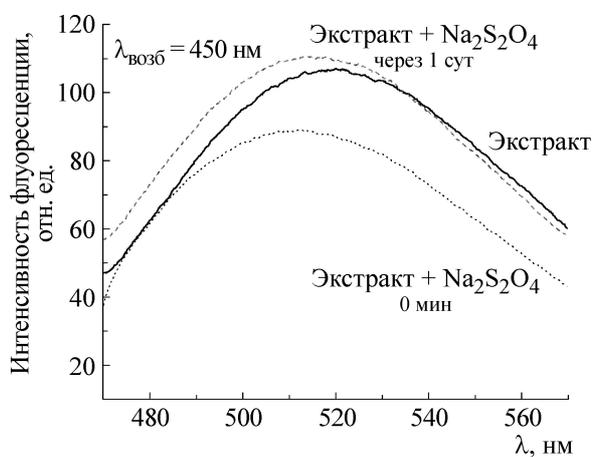


Рис. 9. Спектры флуоресценции грибного экстракта после обработки избытком дитионита натрия.

изменяется и уровень флуоресценции в «синей» области (450 нм). Наблюдаемый незначительный рост флуоресценции в этой области, возможно, обусловлен накоплением продуктов распада рибофлавина, квантовый выход флуоресценции которых значительно ниже.

Обработка рибофлавина избытком дитионита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) переводит рибофлавин в восстановленную форму [14], которая в водном растворе оказывается неустойчивой, и в результате взаимодействия с кислородом воздуха быстро возвращается в окисленную форму. При обработке грибного экстракта избытком дитионита натрия наблюдается падение уровня флуоресценции в «зеленой» области спектра примерно на 24%. Однако уже через 30 мин уровень флуоресценции восстанавливается до исходного и сохраняется в течение суток (рис. 9). Падение уровня флуоресценции только на 24% видимо указывает на то, что часть рибофлавина в грибном экстракте находится в

восстановленном состоянии в составе каких-то комплексов. Добавление избытка дитионита натрия к грибному экстракту, подвергнутому фотолизу, не вызывает изменения спектра флуоресценции, что может служить дополнительным подтверждением того, что происходит выжигание именно рибофлавина.

ВЫВОДЫ

Проведенные исследования показали, что в экстракте гриба *Neonothopanus nambi* содержатся несколько люминофоров, флуоресцирующих как в «синей» области (в районе 450–460 нм), так и в «зеленой» области (525–540 нм). Один из люминофоров, по всей видимости, является рибофлавином или его производным (флавиномононуклеотидом или флавинадениндинуклеотидом). Для выяснения того, какой из выявленных люминофоров входит в систему био-

люминесценции гриба *Neonothopanus nambi*, требуются дополнительные исследования.

Авторы признательны сотрудникам ИБФ СО РАН (Красноярск) А.П. Пузырю, С.Е. Медведевой и В.С. Бондарю за предоставление образцов биомассы мицелия *N. nambi* и полезное обсуждение полученных результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. O. Shimomura, *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods* (World Sci. Publ., 2006).
2. D. E. Desjardin, A. G. Oliveira, and C. V. Stevani, *Photochem. and Photobiol. Sci.* **7**, 170 (2008).
3. V. S. Bondar, A. P. Puzyr, K. V. Purtov, et al., *Luminescence* **27**, 101 (2012).
4. В. С. Бондарь, А. П. Пузырь, К. В. Пуртов и др., Докл. РАН **438** (5), 705 (2011).
5. В. С. Бондарь, А. П. Пузырь, К. В. Пуртов и др., Докл. РАН **455** (3), 346 (2014).
6. Ю. П. Зернов, О. М. Хощенко, В. С. Дедков и др., Биотехнология **1**, 15 (2002).
7. T. V. Kobzeva, A. R. Melnikov, T. Y. Karogodina, et al., *Luminescence* **29**, 703 (2014).
8. D. Uyakul, M. Isobe, and T. Goto, *Bioorg. Chem.* **17**, 454 (1989).
9. K. V. Purtov, V. N. Petushkov, M. S. Baranov, et al., *Angewandte Chemie International Edition* **54** (28), 8124 (2015).
10. М. Диксон и Э. Уэбб, *Ферменты* (Наука, М., 1982), т. 2.
11. Н. П. Елинов, *Основы биотехнологии* (Наука, СПб., 1995).
12. S. Hayashi, R. Fukushima, and N. Wada, *Biophysics* **8**, 111 (2012).
13. А. Я. Розанов, *Экспериментальная витаминология* (Минск, 1979).
14. А. А. Савченко, *Витамины как основа иммунометаболической терапии* (Изд-во КрасГМУ, Красноярск, 2011).

Luminophores of the Luminous Fungus *Neonothopanus nambi*

Yu.P. Zernov*, T.V. Kobzeva*, T.Yu. Dranova*, D.V. Stass*,
A.A. Alekseev*, and A.A. Nefedov**

**Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Novosibirsk, 630090 Russia*

***Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
prosp. Akademika Lavrentieva 9, Novosibirsk, 630090 Russia*

The work presents the results of isolation of luminophores from mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi*. It is shown that in the fluorescence spectrum of original extracts, in addition to a peak in the green region with a maximum at 520–530 nm, that corresponds to emission maximum of the fungus *in vivo*, one more peak of light emission, which has a maximum in the blue region, can be seen. The luminophore that emits in the blue region is an individual substance with a molecular weight of 894 Da. Calculations performed taking into account the isotopic composition of atoms suggest several most probable chemical formulae of the luminophore: $C_{52}H_{65}N_2O_{11}$, $C_{51}H_{65}N_4O_{10}$, $C_{53}H_{61}N_6O_7$, $C_{47}H_{65}N_4O_{13}$, $C_{46}H_{65}N_6O_{12}$. A sample, containing a yellow compound, with fluorescence in the green region was also obtained. One of the luminophores from this sample, apparently, is riboflavin or its derivatives flavin mononucleotide or flavin adenine dinucleotide.

Key words: luminophores, higher luminous fungi, fluorescence, Neonothopanus nambi, mass spectrometry, riboflavin or its derivatives