

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ БАЗИДИОМИЦЕТОВ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ПРИРОДНЫХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ

О.М. Цивилева¹, Т.А. Пучкова², О.В. Кофтин¹, А.А. Аниськов³, Д.Н. Ибрагимов³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия
tsivileva@ibppm.ru

²Государственное научное учреждение Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь, *microbio@mbio.bas-net.by*

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Саратов, Россия, *aniskovalvis@gmail.com*

Аннотация. На примере ряда культур ксилотрофных базидиомицетов разных экологических ниш изучен биосинтез и экзогенное действие важных биологически активных представителей класса гетероциклических соединений, индольных и кумариновых. Изученные базидиомицеты продуцируют широкий спектр соединений группы индола. Соединения, молекулы которых содержат 4-гидроксикумариновый фрагмент, способны выступать в качестве эффекторов формирования защитных систем базидиомицетов при различных стрессовых воздействиях.

Ключевые слова: *высшие грибы, базидиомицеты, природные гетероциклические соединения, биосинтез, биотрансформация*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-799-803

Быстрый рост мицелия высших грибов и особый путь их развития, наряду со сравнительно высокой скоростью продукции органических веществ при формировании плодовых тел, позволяет естественно предположить, что грибы обладают такой системой регуляции, в которой ростовые вещества должны принимать участие. Гормонально контролируемый механизм регуляции роста имеет много общих особенностей у грибов и высших растений. Известно, что не только растения, но и многие симбиотические бактерии, микоризообразующие и патогенные грибы продуцируют β-индол-3-уксусную кислоту (ИУК). Это и другие производные индола занимают одно из ведущих мест среди биологически активных веществ природного и синтетического происхождения.

Получено много доказательств широкого спектра биологического действия хромен-2-онов (кумаринов) природного и синтетического происхождения как основы малотоксичных и высокоэффективных лекарственных препаратов. Кумарины распространены в растительном мире. Естественно предположить, что многие хромен-2-оны способны вовлекаться в биологические процессы, будучи структурно схожими с веществами фитопроисхождения. Однако практически отсутствуют работы, связанные с выявлением и исследованием действия соединений этого класса в отношении высших грибов - биологических объектов, доступных в лабораторных условиях, нетоксичных, характеризующихся устойчиво детектируемым ответом на разнообразные ксенобиотические воздействия окружающей среды.

Нами предпринято изучение продукции базидиомицетами, биологической активности и биотрансформации гетероциклических соединений, включающих индольный или 4-гидроксикумариновый фрагмент.

Продукция индольных соединений под воздействием дифференцированных условий углеродно-азотного питания глубинных культур базидиомицетов. Литературные данные об обнаружении ИУК и исследовании путей биосинтеза этого

вещества у ксилотрофных базидиомицетов крайне немногочисленны. Ранее нами были получены данные о продукции внеклеточных индольных соединений культурой штамма *Lentinula edodes* F-249 [Цивилева и др., 2012]. Соответствующие сведения для внутриклеточных фракций не были получены, а для глубинных культур других базидиомицетов единичны и противоречивы. Актуально выявление и количественная характеристика продукции ИУК и ее индольных прекурсоров погруженными культурами в зависимости от штамма гриба и химического состава питательной среды.

Изучали образование индольных соединений базидиомицетами *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*. Наиболее активными продуцентами ИУК оказались штаммы культивируемых в производственном масштабе грибов *L. edodes* 198 (0,40 мг/г а.с.б.), *P. ostreatus* 69 (0,36 мг/г а.с.б.), дальнейшее изучение образования индольных веществ у которых представляло большой интерес.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проведено изучение набора и относительного содержания индольных соединений, присутствующих в мицелии грибов-активных продуцентов фитогормона: *L. edodes* 198, *P. ostreatus* 69, а также для сравнения – у наименее «активного» штамма шиитаке *L. edodes* 182. Оказалось, что шиитаке и вешенка устричная образуют достаточно широкий спектр внутриклеточных соединений индольной природы. На основании полученных результатов для дальнейших исследований отобраны штаммы *L. edodes* 198 и *P. ostreatus* 69.

В качестве факторов питательной среды, влияющих на образование индольных веществ выбраны итамами, изучали источники углеродного, азотного питания, исходную кислотность среды, температуру культивирования.

Исследование динамики накопления индольных соединений в мицелии изучаемых грибов показало, что у *L. edodes* 198 в экспоненциальной фазе роста преобладали триптофан и триптамин, в незначительном количестве обнаружена ИУК, в то время как у *P. ostreatus* 69 – индол-3-карбоксияльдегид (ИКА) и ИУК. При последующем культивировании у *L. edodes* 198 обнаружен также ИКА. В стационарной фазе культивирования у *P. ostreatus* 69, наряду с ранее идентифицированными соединениями, обнаружены также триптофан и триптамин. Следовательно, содержание индольных соединений в биомассе исследуемых грибов коррелировало с их накоплением в культуральной жидкости.

В итоге представлена характеристика состава группы внутриклеточных индольных соединений базидиомицетов родов *Ganoderma*, *Laetiporus*, *Lentinula*, *Pleurotus* в зависимости от условий культивирования. Проведено качественное изучение индольных соединений, присутствующих в мицелии. У двух штаммов *L. edodes* выявлено необычное преобладание индола. Наибольшим разнообразием индольных соединений (индол, триптофан, индолацетамид, 5-ОН-ИУК, ИУК, триптамин) отличался штамм *P. ostreatus* 69. Изучение образования соединений фитогормональной природы выявило достаточно активную продукцию индолил-3-уксусной кислоты у *L. edodes* 198, *P. ostreatus* 69, – уровень продукции ИУК составил 0,1-0,42 мг/г абсолютно сухой биомассы, выявлена положительная корреляция с ростовыми характеристиками культур.

Изученные макробазидиомицеты образуют широкий спектр соединений группы индола, производные которого занимают одно из ведущих мест среди биологически активных веществ природного и синтетического происхождения наряду с другими гетероциклическими соединениями - производными кумарина.

Биотрансформация базидиомицетами и биологическая активность систем, включающих 4-гидроксикумариновый фрагмент. Значительное число природных и

синтетических производных хромен-2-она являются биологически активными веществами с широким спектром активности [Парфёнов, Смирнов, 1992; Luan et al., 2002; Gowrishankar, Rao, 2007]. Нами обнаружено влияние систем, содержащих 4-гидроксикумариновый фрагмент, на плодоношение высших грибов.

Ксилотрофные базидиомицеты – представители рода *Ganoderma* являются одними из наиболее биотехнологически ценных высших грибов съедобных и/или лекарственных видов [De S. Pereira-Jr et al., 2013]. Нашей задачей явилась характеристика эффектов некоторых 4-гидроксикумаринов на формирование плодовых тел базидиомицетов рода *Ganoderma* в искусственной культуре.

Реакционная способность замещенных 2Н-хромен-2-онов и успехи их практического использования в значительной степени зависят от функциональных групп, формирующих скелет молекулы. Представляется, что значительный потенциал биологической активности 3-замещенных (4-гидрокси)-2Н-хромен-2-онов связан с наличием карбонильных групп различного характера (кетонной и лактонной), гетероциклической системы, способной к рециклизации [Кумаргалиева и др., 2013], некоторыми другими факторами.

Мы исследовали влияние оксопропил-4-гидроксихроменонов на глубинные культуры макробазидиомицетов *Ganoderma applanatum*, *G. cattiensis*, *G. colossus*, *G. lucidum*, *G. neojaponicum*, *G. valesiacum*. Синтезированные (СГУ) 4-гидрокси-3-(3-оксо-1,3-дифенилпропил)-хромен-2-он соединение S(45) и 4-гидрокси-3-(3-оксо-1-(3-нитрофенил)-3-фенилпропил)-хромен-2-он (соединение S(NO₂)) (рисунок) использовали в качестве компонентов питательных сред грибов.

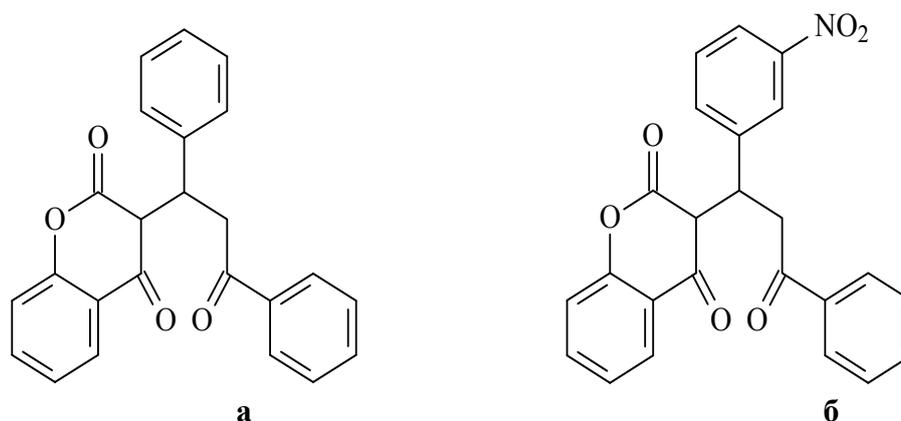


Рисунок. Структурные формулы соединений, использованных в работе: (а) 4-гидрокси-3-(3-оксо-1,3-дифенилпропил)-хромен-2-он; (б) 4-гидрокси-3-(3-оксо-1-(3-нитрофенил)-3-фенилпропил)-хромен-2-он.

В отсутствие добавок соединений S(45) и S(NO₂), как и в присутствии соединения S(NO₂) плодоношения при использованных внешних условиях не наблюдали. Позитивным действием, наиболее выраженным в отношении индукции плодоношения *G. cattiensis*, *G. colossus* и *G. neojaponicum*, обладало соединение S(45).

На уровне химической структуры молекул в рассматриваемой группе соединений S(45) и S(NO₂) наличие электроноакцепторных заместителей в кольце ароматического заместителя, таких как нитрогруппа (соединение S(NO₂)), оказывает негативное влияние на проявление рассматриваемого вида биологической активности.

Известно, что эффект действия препаратов из класса антиоксидантов, к которым относят и кумарин-содержащие субстанции [Парфенов, Смирнов, 1992], может быть связан не только с их антиоксидантными свойствами, но также с их воздействием на

различные сигнальные системы. Полиоксосоединения лактонной природы 2Н-хромен-2-онового ряда способны участвовать как в процессе антиоксидантной защиты, так и в индукции апоптоза, и, аналогично другим биологически активным соединениям, осуществлять указанные эффекты путем прямого взаимодействия с белками или при ингибировании их экспрессии. По-видимому, рассматриваемые производные кумарина оказывают воздействие на сигнальные системы грибных клеток, в том числе на молекулярные мишени путей апоптоза. При неблагоприятных условиях роста культур базидиомицетов возникают биохимические условия возникновения стадий морфогенеза, предшествующих плодоношению. Может происходить взаимодействие соединений-добавок с важнейшими биологически активными соединениями (как антиоксидантной природы, так и вызывающими окислительный стресс; с соединениями другой природы, принимающими участие в цитодифференцировке у высших грибов), и развивается плодоношение.

Для изучения условий и продуктов биотрансформации синтетических кумаринов культурами базидиомицетов проводили хроматографическое исследование низкомолекулярных внеклеточных метаболитов. В работе исследовали экстракты культуральной жидкости 9-ти штаммов глубинных культур *Ganoderma applanatum*, *G. cattienensis*, *G. colossus*, *G. lucidum*, *G. neojaponicum*, *G. valesiacum*, выращенных в присутствии S(45) и S(NO₂).

Результаты ВЭЖХ-исследования низкомолекулярных внеклеточных метаболитов грибов рода *Ganoderma*, культивированных в присутствии 4-гидрокси-3-(3-оксо-1,3-дифенилпропил)-хромен-2-она и 4-гидрокси-3-(3-оксо-1-(3-нитрофенил)-3-фенилпропил)-хромен-2-она, показали наличие биотрансформации указанных соединений по схеме, общей для разных видов, с имеющимися штаммовыми различиями. Так, при культивировании с S(NO₂) выявлены два преобладающих внеклеточных метаболита, идентичных у всех штаммов, кроме *G. applanatum* 0154. Еще один метаболит присутствовал не только во всех образцах при их получении с S(NO₂), но и при культивировании разных видов с S(45): *G. cattienensis* SIE1302, *G. lucidum* 1315 и *G. applanatum* 0154. Показано, что 4-гидроксикумарины перспективны как биологически активные соединения в решении некоторых проблем культивирования высших грибов и защиты растений.

Работа частично поддержана грантом РФФИ (проект № 16-08-01170-а).

Литература

Кумаргалиева (Ибрагимова) Д.Н., Федотова О.В., Мажукина О.А. Реакция Манниха в ряду замещенных 4-гидрокси-2н-(пирон)хромен-2-онов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2013. – Т. 13, № 4. – С. 19–23.

Парфенов Э., Смирнов Л. Гетероциклические биоантиоксиданты // Химия гетероциклических соединений. – 1992. – № 3. – С. 329–334.

Цивилева О.М., Лощинина Е.А., Макаров О.Е., Никитина В.Е. Синтез ауксина высшим грибом *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. в присутствии низких концентраций соединений группы индола // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48, № 3. – С. 313–322.

De S. Pereira-Jr J.A., Rodrigues D.P., Peixoto-Filho R.C., Bastos I.V.G.A., De Oliveira G.G., Araújo J.M., Melo S.J. Contribution to pharmacognostic and morphoanatomical studies, antibacterial and cytotoxic activities of *Ganoderma parvulum* Murrill (Basidiomycota, Polyporales, Ganodermataceae) // Latin American Journal of Pharmacy. – 2013. – V. 32, No. 7. – P. 996–1003.

Gowrishankar G., Rao J. Visualizing RNA splicing *in vivo* // Mol. BioSyst. – 2007. – No. 3. – P. 301–307.

Luan X.H., Cerqueira N., Oliveira A. Synthesis of fluorescent 3-benzoxazol-2-yl-coumarins // Advances in Colour Science and Technology. – 2002. – V. 5, No. 1. – P. 18–22.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSE OF BASIDIOMYCETES TO SEVERAL NATURAL HETEROCYCLES EXPOSURE

O.M. Tsivileva¹, T.A. Puchkova², O.V. Koftin¹, A.A. Aniskov³, D.N. Ibragimova³

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia, tsivileva@ibppm.ru

²Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, microbio@mbio.bas-net.by

³Saratov State University, Saratov, Russia, aniskovalvis@gmail.com

Abstract. Biosynthesis and exogenic action of important biologically active representatives of heterocyclic compounds, indole and coumarin groups, have been studied exemplified by a number of cultures of xylotrophic basidiomycetes from different ecological niches. Basidiomycetes under question produce a wide spectrum of indolic compounds. The substances which molecules contain the 4-hydroxycoumarin fragment, are capable of effecting the defense systems occurrence in basidiomycetes at different stress impacts.

Keywords: *higher fungi, basidiomycetes, natural heterocyclic compounds, biosynthesis, biotransformation*