



УДК 582.28:57.083

## ВЫЯВЛЕНИЕ УЧАСТИЯ ИНДОЛА В РОСТОВЫХ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА

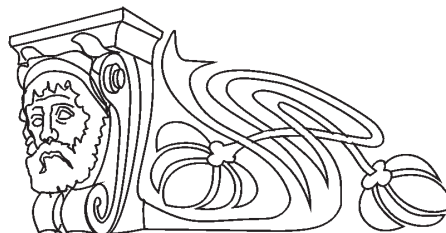
А. Н. Панкратов, Е. А. Лощинина<sup>1</sup>, О. М. Цивилева<sup>1</sup>,  
О. Е. Макаров<sup>1</sup>, Н. А. Юрасов, В. Е. Никитина<sup>1</sup>

Саратовский государственный университет

E-mail: PankratovAN@info.sgu.ru

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов

E-mail: tsivileva@ibppm.sgu.ru



Выявлен эффект экзогенного индола в отношении ростовых характеристик базидиомицета *Lentinula edodes* при глубинном культивировании, проявляющийся в снижении биомассы мицелия в интервале значений концентрации добавки  $10^{-4}$ – $10^{-1}$  г/л. Индол стимулировал продукцию индолил-3-уксусной и индолил-3-пировиноградной кислот. Набор экстраклеточных соединений индольной природы на обогащенных индолом средах включал, кроме того, триптамин, триптофан, индолил-3-ацетамид, биосинтез которых подавляло присутствие экзогенного индола в разной степени в зависимости от концентрации добавки и возраста грибной культуры. Направление биохимической трансформации индола в этих условиях – образование оксиндола (фталимидина).

**Ключевые слова:** внеклеточные соединения индольной природы, биохимическая трансформация, высокоэффективная жидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, гриб шиитаке.

### Elucidating the Indole Participation in Growth and Metabolic Processes in Mycelial Fungus

A. N. Pankratov, E. A. Loshchinina, O. M. Tsivileva,  
O. E. Makarov, N. A. Yurasov, V. E. Nikitina

The effect of exogenous indole in respect to growth characteristics of the basidiomycete *Lentinula edodes* submerged culture has been revealed to manifest itself in the mycelial biomass diminution at the indole concentration of  $10^{-4}$ – $10^{-1}$  g/l. The production of indolyl-3-acetic and indolyl-3-pyruvic acids was stimulated by indole. The set of mushroom's extracellular compounds of indolic nature on the indole-enriched media included also tryptamine, tryptophane, indolyl-3-acetamide. The biosynthesis of these compounds was suppressed by exogenous indole to a variable extent depending on the addition's concentration and fungal culture age. The pathway of indole biochemical transformation under these conditions was observed in the form of oxindole occurrence.

**Key words:** extracellular compounds of indolic nature, biochemical transformation, high performance liquid chromatography, chromatomass-spectrometry, shiitake mushroom.

Известно, что соединения индольной природы принимают участие в процессах роста и дифференцировки не только у растений (фитогормон индолил-3-уксусная кислота, ИУК), но и у грибов. Однако в отношении класса грибов-

базидиомицетов этот вопрос до сих пор остается практически не исследованным. Сведения об индоле как биологически активном соединении в связи с метаболизмом высших грибов единичны. Из литературных данных известно, например, что мутантные штаммы базидиомицета *Schizophyllum commune*, вырабатывающие синий пигмент индиготин, разлагают индол с образованием индиготина и ИУК [1]. Существует вероятность, что эти фитогормон и пигмент продуцируются культурой как средство детоксификации индола, токсичная для гриба концентрация которого очень низка. Накопление, в свою очередь, ИУК до токсикогенного уровня предотвращается либо ее дальнейшим распадом, либо полимеризацией с образованием нерастворимых соединений.

Изучение роли соединений, отвечающих за пигментообразование и последующую дифференцировку клеток высших грибов, позволит расширить спектр фундаментальных знаний о регуляторных механизмах грибных культур. Несомненно, к числу таких соединений можно отнести окисленные производные индола, участие которых в превращениях 5,6-дигидроксииндол – индол-5,6-хинон – меланохром – меланин, в случае катализа грибными тирозиназами приводящих к образованию меланиновых пигментов грибов, известно достаточно давно [2, 3].

Актуально изучение вопроса о том, какое влияние в принципе оказывает индол, токсичный для ряда микроорганизмов, на накопление биомассы биологического объекта – ценного высшего культивируемого гриба *Lentinula edodes* (шиитаке), какие еще индольные соединения продуцируются *L. edodes* в зависимости от начальной концентрации добавки индола в питательной среде, а также в зависимости от продолжительности выращивания мицелия. Наконец, важно выяснить, способен ли базидиомицет утилизировать индол.

Настоящая работа посвящена выявлению эффекта экзогенного индола на ростовые характеристики *L. edodes* при глубинном культивировании,



экспериментальному обнаружению продукции индолил-производных на обогащенных индолом средах, а также направления биохимической трансформации индола в процессе метаболизма.

### Материалы и методы

В работе использовали культуру *Lentinula edodes*, штамм F-249, полученный из коллекции высших базидиальных грибов кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета.

Для идентификации и количественного определения индольных соединений в культуральной жидкости (КЖ) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) глубинную культуру гриба выращивали на жидкой синтетической глюкозо-аспарагиновой среде (*D*-глюкоза – 50 ммоль/л, *L*-аспарагин – 10 ммоль/л). Для определения сухой биомассы мицелия шиитаке мицелий фильтровали через предварительно взвешенные на аналитических весах фильтры, высушивали до постоянной массы и вновь взвешивали.

При исследовании влияния соединений индольной природы в подвергнутую предварительному автоклавированию глюкозо-аспарагиновую среду непосредственно перед посевом в стерильных условиях вносили в виде этанольных растворов добавки: индол, триптамин, индолил-3-ацетамид, индолил-3-пировиноградную кислоту ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  и  $10^{-1}$  г/л), *D,L*-триптофан (0.01 и 0.1 г/л). Пробы культуральной жидкости отбирали в стерильных условиях на 3, 7, 10, 14, 21-е сут роста.

В качестве стандартов использовали чистые коммерческие препараты – соединения, известные как предшественники ИУК по триптофанзависимому и триптофаннезависимому биосинтетическим путям – индол, триптамин (ТАМ), триптофан, индолил-3-ацетальдегид (ИААльд), индолил-3-ацетамид (ИААм), ИУК, 5-гидроксииндолил-3-уксусную кислоту (5-гидрокси-ИУК), индолил-3-пировиноградную кислоту (ИПВК) и антралиловую кислоту. Пробы КЖ отбирали в стерильных условиях в процессе роста культуры, фильтровали, используя фильтры фирмы «Millipore» (Ирландия) типа 0.22 мкм GVPP (торговой марки «Durapore® membrane filters»), и анализировали на приборном комплексе «Millichrom» фирмы «Laboratorni Pistroje» (Прага, Чехия), который включает High-pressure pump HPP-5001, UV-vis detector LCD-2563, Computing integrator CI-100A, Line recorder TZ-4620. Эксперименты по распределительной обращенно-фазовой ВЭЖХ проводили на носителе с химически связанными гидрофобными остатками  $C_{18}$  (5 мкм). Колонка (150 x 4.6 мм) Luna 5μ C18(2) («Phenomenex», США), снабженная предколонкой (типа «Security Guard»)

той же марки. Элюент – смесь метанол : вода (36 : 64 либо 50 : 50, v/v). Использовали детектор УФ поглощения, работающий в диапазоне длин волн 250–300 нм. Объем пробы 20 мкл, давление 12 МПа. Эксперимент проводили в нетермостатируемых условиях при комнатной температуре, поэтому время удерживания стандартов постоянно контролировали в каждой серии экспериментов.

Для хромато-масс-спектрометрического исследования (в варианте ГХ-МС) образцы мицелия выращивали глубинным способом на вышеописанной глюкозо-аспарагиновой синтетической среде при температуре 26 °С в течение 28 сут в присутствии индола или *L*-триптофана. Для сравнительного изучения способности к утилизации индола закаленным (подвергнутым воздействию неоптимальных температурных условий) и незакаленным мицелием варьировали температуру выращивания посевного материала. Создавали условия холодного шока, подвергая посевной мицелий воздействию пониженной температуры (4 °С) в течение 7 сут перед засевом жидких питательных сред. По завершении процесса культивирования фильтраты культуральных жидкостей обрабатывали этилацетатом (хч), который оказался оптимальным растворителем-экстрагентом для разделяемой смеси, применяя экстракцию 200 мл КЖ двумя порциями по 20 мл экстрагирующего агента. Объединенный экстракт упаривали до конечного объема 2 мл при температуре 35 °С и подвергали анализу на газовом хромато-масс-спектрометре Trace GC – Trace DSQ (газовый хроматограф Trace GC, соединенный с масс-детектором Trace DSQ) (фирма «ThermoFinnigan», США).

Подвижная фаза: гелий 99.995%-ной чистоты, скорость потока 1.2 мл/мин.

Марка хроматографической колонки: Restek Stabilwax, 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина фазы 0.25 мкм.

Время анализа 55.00 мин.

Температурная программа: 10 мин при 150 °С, затем нагрев со скоростью 2 °С/мин до 220 °С и термостатирование при 220 °С в течение 10 мин.

Температура инжектора (испарителя) 290 °С, температура источника ионов 200 °С.

Диапазон сканирования 50–300 а. е. м. (Full Scan), режим газопотока Splitless (без сброса пробы, нагреваемой в инжекторе в течение 1 мин).

Температура MS Transfer Line 250 °С.

Время включения филамента (источник электронов, катод) через 4.00 мин после инъекции образца. Энергия электронов 70 эВ.

Объем анализируемой пробы 1 мкл.

Использована библиотека масс-спектров NIST 2.0 Национального института стандартов и технологии США.



Общая характеристика образцов представлена в табл. 1. Распознавание обнаруженных соединений проводили путем сравнения полученных масс-спектров с масс-спектрами библиотеки NIST 2.0. В рамках выполненной работы были идентифицированы органические вещества, вероятность обнаружения которых составила более 90%.

Таблица 1

Общая характеристика образцов мицелия *Lentinula edodes* F-249 для хромато-масс-спектрометрического исследования

Номер образца	Добавка	Характеристика посевного материала
1	Индол, 0.001 г/л	–
2	Индол, 0.001 г/л	Холодовой шок
3	Индол, 0.1 г/л	–
4	Индол, 0.1 г/л	Холодовой шок
5	L-триптофан, 0.1 г/л	–
6	L-триптофан, 0.1 г/л	Холодовой шок

### Результаты и их обсуждение

#### Ростовые характеристики *Lentinula edodes*

В результате проведенных исследований обнаружено, что индол не оказывал положительного влияния на накопление биомассы *L. edodes*. Он вызывал заметное снижение биомассы по сравнению с контролем (до 34% на среде со 100 мг/л индола на 17-е сут культивирования) и сильно замедлял рост культуры. Из рис. 1 видно, что кривые роста (зависимости накопления сухой биомассы мицелия от продолжительности выращивания) практически всегда расположены ниже «контрольной» кривой, соответствующей культивированию в отсутствие экзогенного индола.

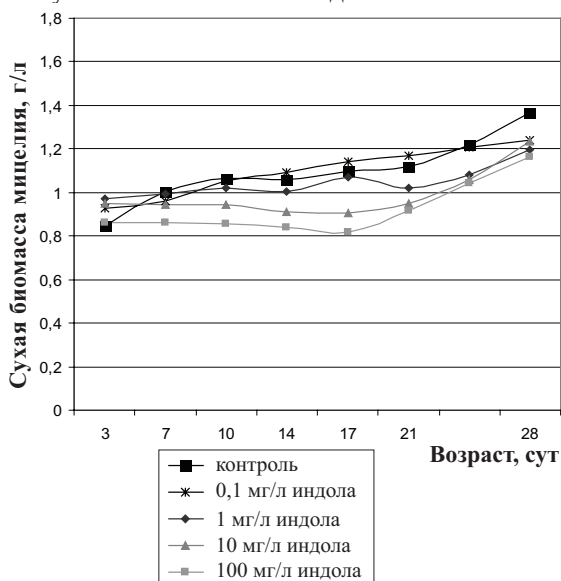


Рис. 1. Накопление биомассы мицелия *Lentinula edodes* F-249 на средах с индолом. «Контроль» – отсутствие искусственной добавки индола к среде

#### Внеклеточные индолные метаболиты *L. edodes* F-249

Методом ВЭЖХ мы изучили состав культуральной жидкости *L. edodes* F-249, выращенной на изначально не содержащей добавок глюкозо-аспарагиновой среде, с целью определить наличие и количественное содержание в ней N-гетероциклических соединений ряда индола.

Оказалось, что изученный штамм *L. edodes* синтезирует аминокислоту триптофан (рис. 2).

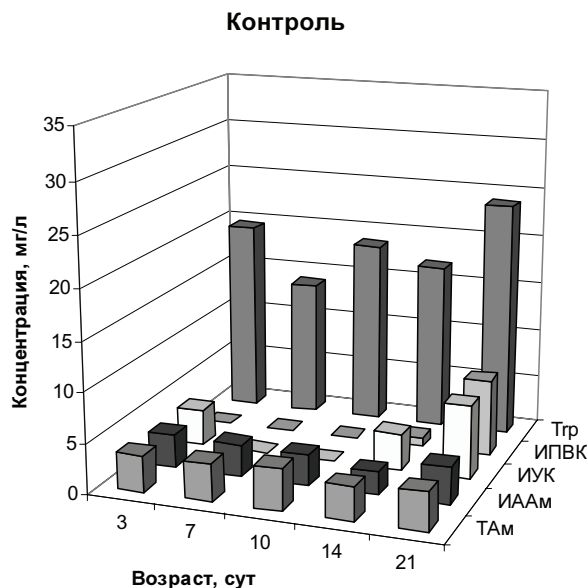


Рис. 2. Индолные соединения культуральной жидкости *Lentinula edodes* F-249 в отсутствие искусственной добавки индола к среде

На среде, изначально не содержащей этого вещества, концентрации внеклеточного триптофана колебались в пределах от 13.8 мг/л на 7-е сут до 23.9 мг/л на 21-е. При этом снижение концентрации наблюдалось на 7 и 14-е сут. Для всех изученных возрастов культуры внесение в среду добавок триптофана (10 и 100 мг/л) привело к значительному повышению содержания этого вещества в КЖ по сравнению с исходным. Максимальная концентрация триптофана – 327 мг/л – отмечена на 14-е сут на среде с добавкой 100 мг/л этой аминокислоты.

Было выявлено, что гриб выделяет ИУК в среду (см. рис. 2). В контрольном опыте наибольшая концентрация индолил-3-уксусной кислоты – 7.43 мг/л – наблюдалась на 21-е сут. При добавлении триптофана содержание ИУК повысилось и достигло максимума – 9.33 мг/л – на 14-е сут на среде с добавкой 100 мг/л аминокислоты, т. е. в точке с наибольшей концентрацией триптофана.

Также в КЖ были обнаружены ТАМ и ИААм (см. рис. 2). Содержание этих веществ оставалось



на одном достаточно стабильном уровне на протяжении всего времени культивирования и колебалось в пределах 3.40–4.23 мг/л для триптамина и 2.27–3.70 мг/л для ИААм.

Индолил-3-пировиноградная кислота (ИПВК) появилась на 14-е сут (0.93 мг/л), а к 21 сут ее содержание повысилось до 7.70 мг/л.

Индол в КЖ отсутствовал (см. рис. 2).

Среды с добавлением индола характеризовались достаточно высоким содержанием ИУК (до 9 мг/л) на 14–21 сут культивирования, причем концентрация образовавшейся ИУК не зависела от исходной концентрации индола. Исключение составила среда со 100 мг/л индола, где на 21-е сут уровень ИУК снизился, причем концентрация ИПВК в этой же точке резко увеличилась. Данные

представлены на рис. 3. Таким образом, индол стимулирует синтез ИУК.

На средах с индолом наблюдалось снижение уровня триптамина, триптофана, отсутствовал индолил-3-ацетамид на 7–10 сут (в отличие от контроля). Другую картину можно было видеть для ИПВК, которая, напомним, в контрольном опыте детектировалась только начиная с 14 сут выращивания. При экзогенном введении индола ИПВК присутствовала в культуральной жидкости уже на 3-и сут роста в заметной концентрации (до 0.97 мг/л). Однако прямая зависимость между концентрацией добавки и содержанием ИПВК отсутствовала и наибольшее содержание ИПВК наблюдалось в случае 0.1 и 100 мг/л индола – 11.6 и 16.7 мг/л соответственно (см. рис. 3), – превы-

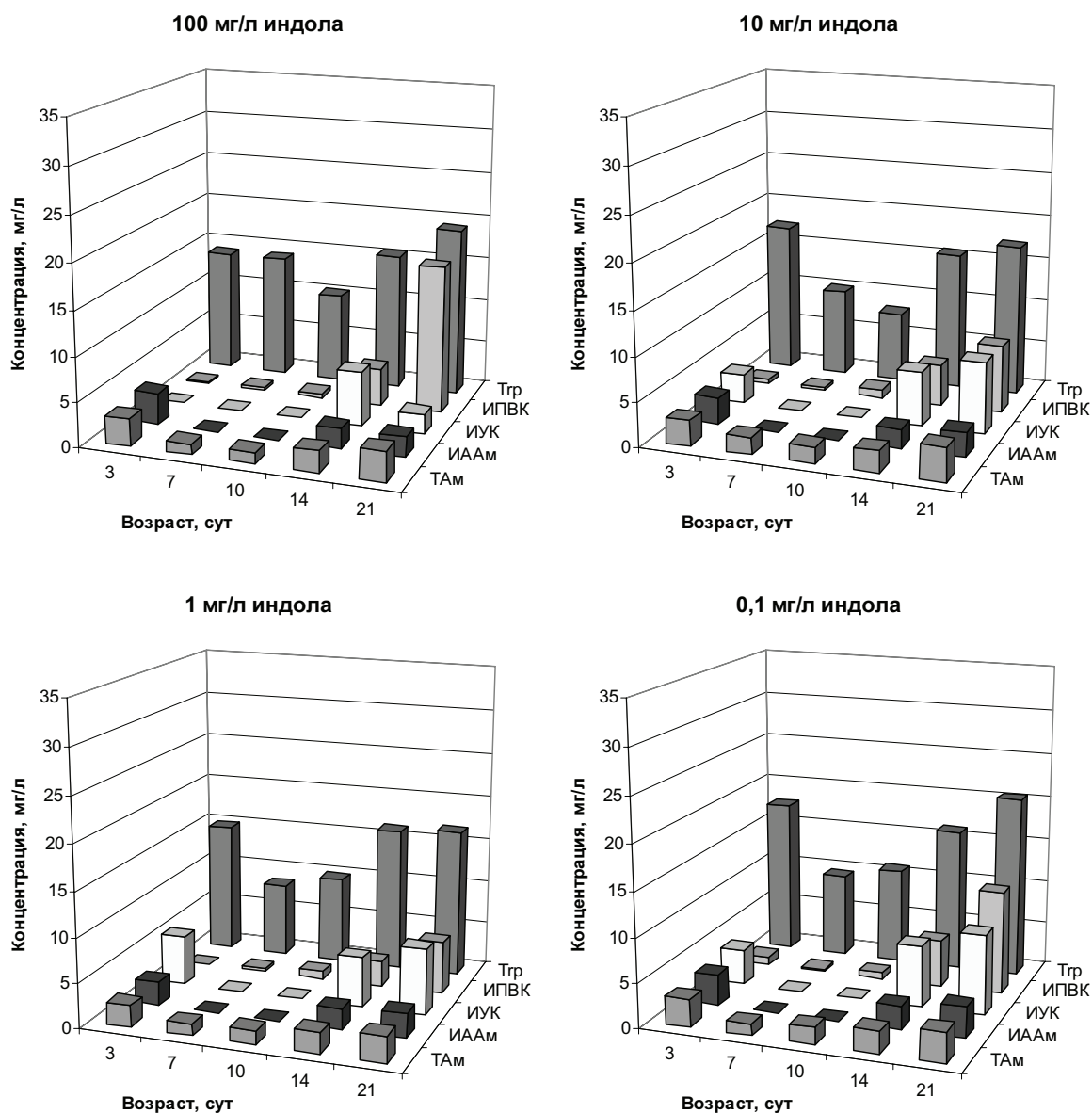


Рис. 3. Индольные соединения культуральной жидкости *Lentinula edodes* F-249 при различной начальной концентрации индола в среде



шая величины контрольного варианта эксперимента в 1.5 и 2.2 раза. При возрасте грибной культуры 14 сут относительное (по сравнению с контрольным) увеличение концентрации ИПВК еще более значительно: от 3.0 до 5.7 раза в зависимости от величины добавки индола. Значит, индол стимулирует продукцию ИПВК культурой если не *de novo*, то путем трансформации присутствующих в питательной среде ароматических соединений.

#### Трансформация индола глубинной культурой шиитаке

При ВЭЖХ-исследовании состава спектра внеклеточных метаболитов в условиях глубинной культуры на средах с добавками  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  и  $10^{-1}$  г/л индола оказалось, что индол не обнаруживается ни в одной из проб, в том числе и в тех случаях, когда его добавляли в среду перед началом культивирования гриба (см. рис. 3). Как видно из кривой роста (см. рис. 1), на исследованный нами штамм шиитаке индол оказывает негативное влияние. Можно предположить, что *L. edodes* F-249 трансформирует индол для нейтрализации его отрицательного воздействия.

В этой связи перед нами возникли задачи получения на основе мицелиальных экстрактов

образцов для хромато-масс-спектрометрического исследования (см. раздел «Материалы и методы») соединений, синтезируемых грибом при его культивировании в присутствии индола или для сравнения триптофана, и выявления таким путем направления биохимической трансформации индола в процессе метаболизма.

В образцах с концентрацией добавки индола 0.1 г/л с помощью метода ГХ-МС нами обнаружены индол и оксиндол (фталимидин). Хроматограмма и масс-спектры представлены на рис. 4. Если посевной материал предварительно подвергали холодовому шоку, то, помимо названных соединений, зарегистрировано образование 1-(4-аминофенил)-1-пропанона (4'-аминопропиофенона). Хроматограмма и масс-спектры приведены на рис. 5. Предполагаемое отнесение сигналов в масс-спектрах представлено в табл. 2.

Принимая значения калибровочных коэффициентов веществ одинаковыми, мы оценили мольное соотношение компонентов в образцах № 3 и 4 по площади хроматографических пиков:

№ 3: индол : оксиндол = 5 : 1;

№ 4: индол : оксиндол : 4'-аминопропиофенон = 36 : 6 : 1.

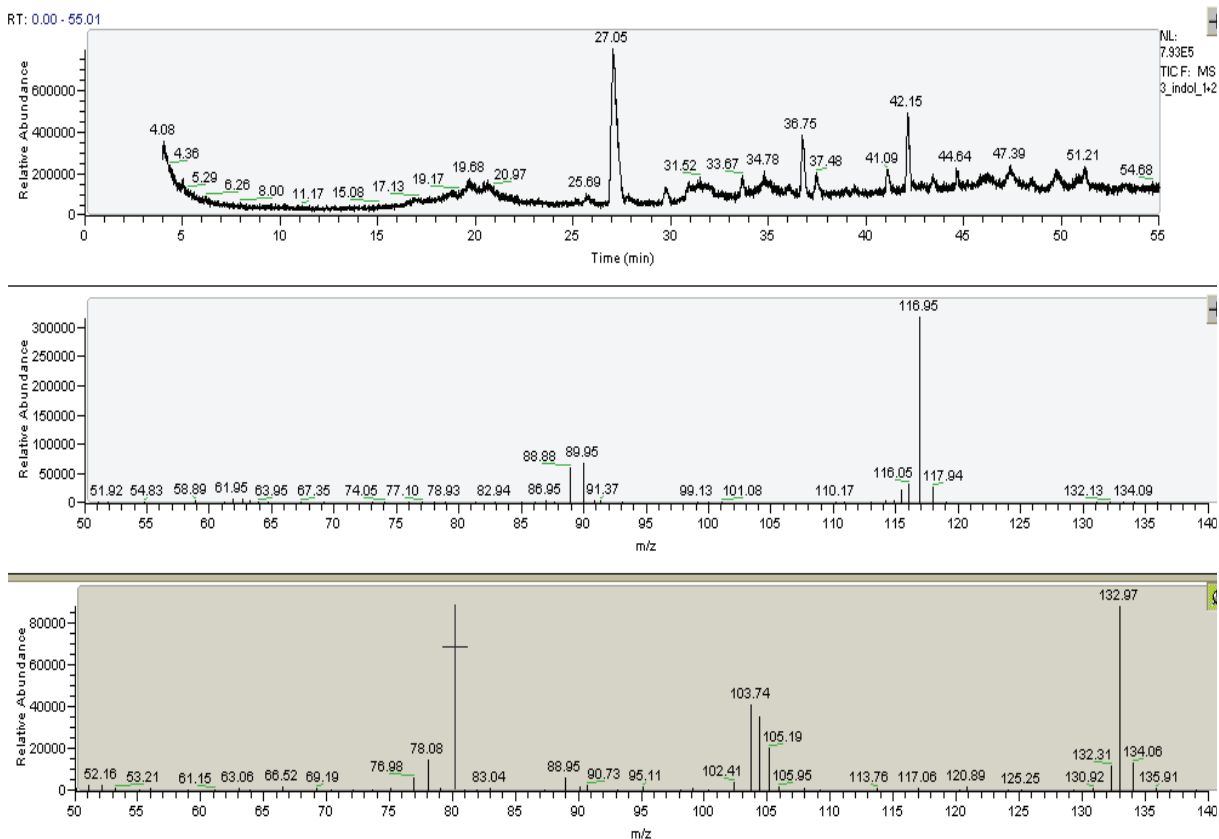


Рис. 4. Хроматограмма и масс-спектры образца № 3 (табл. 1): 1) индол (время удерживания 27.05 мин); 2) оксиндол (фталимидин) (время удерживания 42.15 мин)

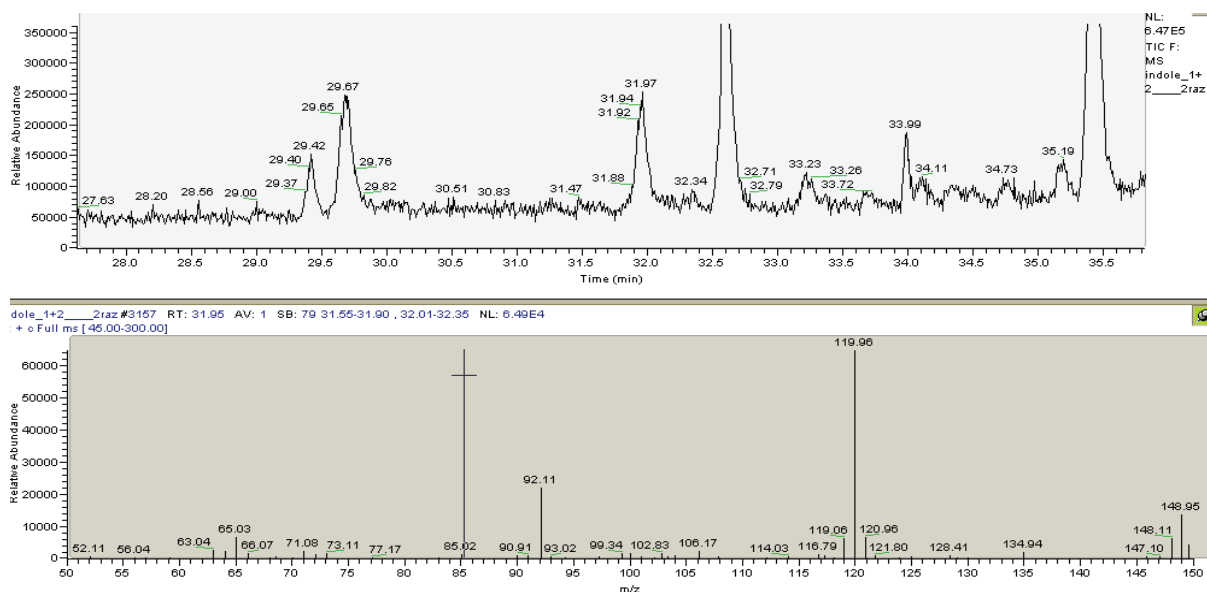


Рис. 5. Хроматограмма и масс-спектры образца № 4 (табл. 1): 1-(4-аминофенил)-1-пропанон (4'-аминопропиофенон) (время удерживания 31.97 мин) (в образце № 3 не обнаружен)

Таблица 2

Предполагаемое отнесение сигналов в масс-спектрах образцов 3 и 4, описанных в табл. 1

Название	Время удерживания, мин	Характерные сигналы в масс-спектре*
Индол	27.05	116 (M-1), 90, 89 (M-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )
Оксиндол	42.15	133 (M+1), 105, 104 (M-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ), 103, 80
4'-аминопропиофенон	31.97	149 (M), 120 (M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ), 92 (M-COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 85

Примечание. \*M – обозначение молекулярного иона и его относительной молекулярной массы.

В образцах № 1, 2, 5, 6 не обнаружено конкретных химических соединений. Наблюдаемые на хроматограммах пики проявляются на уровне шума.

Кроме индола, оксиндола и 4'-аминопропиофенона, при анализе всех образцов зарегистрированы насыщенные углеводороды (тетракозан  $n$ -C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>, пентакозан  $n$ -C<sub>25</sub>H<sub>52</sub>, их изомеры и гомологи), терефталевый диальдегид 1,4-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(CH=O)<sub>2</sub>, ди- $n$ -бутилфталат 1,2-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(COOC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>- $n$ )<sub>2</sub>. Появление сигналов этих соединений вызвано смыванием растворителем веществ с хроматографической колонки, примесями в этилацетате.

Общепринято мнение о том, что индолные производные грибов – продукты трансформации триптофана. Выявленный нами путь деградации индола для базидиомицетов не был известен. Что касается грибов вообще, лишь в 1990 г. появилась работа, позиционированная ее авторами как «первое сообщение о деградации индола грибом» [4]. К тому же объектом исследований служил представитель низших грибов (*Aspergillus niger*), а не класса базидиомицетов, к которым принадлежит изучаемый нами *L. edodes*.

Таким образом, нами установлены основные закономерности в изменении ростовых характеристик культуры в зависимости от уровня

экзогенного индола и продолжительности выращивания. Индол вызывает заметное снижение биомассы гриба, подтверждается предположение о стресс-индуцирующей роли индола в отношении глубинной культуры базидиомицета. Выявлена продукция ряда родственных индолу N-гетероциклических соединений среди метаболитов глубинной культуры *Lentinula edodes* F-249, подтверждена ксенобиотическая природа индола. Предстоит углубленное исследование способности изучаемого биологического объекта к окислительной трансформации индола.

#### Список литературы

1. Epstein E., Miles P. G. Identification of Indole-3-acetic Acid in the Basidiomycete *Schizophyllum commune* // Plant Physiol. 1967. Vol. 42, № 7. P. 911–914.
2. Mason H. S., Peterson E. W. Melanoproteins I. Reactions Between Enzyme-Generated Quinones and Amino Acids // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects. 1965. Vol. 111, № 1. P. 134–146.
3. Choi S. W., Sapers G. M. Purpling Reaction of Sinapic Acid Model Systems Containing L-DOPA and Mushroom Tyrosinase // J. Agric. Food Chem. 1994. Vol. 42, № 5. P. 1183–1189.
4. Kamath A. V., Vaidyanathan C. S. New Pathway for the Biodegradation of Indole in *Aspergillus niger* // Appl. Environ. Microbiol. 1990. Vol. 56, № 1. P. 275–280.