

УДК 579.66

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СИБИРСКИХ ШТАММОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ – ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛАЗНОГО ДЕЙСТВИЯ

© Ю.А. Литовка^{1,2*}, И.Н. Павлов^{1,2}, П.В. Маколова¹, А.А. Тимофеев³, Е.А. Литвинова^{2,3},
А.А. Васильева², А.В. Шабанов^{3,4}

¹ Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН,
Академгородок, 50/28, Красноярск, 660036 (Россия),
e-mail: litovkajul@rambler.ru

² Сибирский государственный университет науки и технологий имени
академика М.Ф. Решетнёва, пр. Мира, 82, Красноярск, 660049 (Россия)

³ Красноярский научный центр СО РАН, Академгородок, 50, Красноярск,
660036 (Россия)

⁴ Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН, Академгородок, 50/43,
Красноярск, 660036 (Россия)

Представлены результаты исследования дереворазрушающих свойств сибирских штаммов ксилотрофных базидиомицетов *Armillaria*, *Ganoderma*, *Fomitopsis*, *Heterobasidion* и *Porodaedalea*. Определены их ростовые параметры и ферментативная активность при твердофазном и глубинном культивировании. Быстрорастущими культурами на целлюлозо-, танинсодержащих средах, хвойных и лиственных субстратах (исходных и гидродинамически активированных) являются *Fomitopsis pinicola* и *Ganoderma lucidum*. Базидиальные грибы проявляют различную ростовую реакцию на предварительную гидродинамическую активацию березовых опилок (ускорение роста / замедление / индифферентность). Максимальная дереворазрушающая активность на древесине *Abies sibirica* отмечена для грибов *Armillaria borealis*, *Ganoderma tsugae*, *G. lucidum*, *F. pinicola* и *Porodaedalea niemelaei*: убыль массы субстрата составила 8–11%; сумма полисахаридов уменьшилась в 1.4 раза преимущественно за счет ферментализации трудногидролизующих полисахаридов. Высокие показатели ферментативной активности грибов отмечены при твердофазном и глубинном культивировании с индуктором. Максимальная активность фенолоксидазы характерна для *G. tsugae* (1.2 ед/г·с); карбоксиметилцеллюлазы – для штаммов *F. pinicola* и *G. lucidum* (11.8 и 10.3 ед/мл); ксиланазы – для *H. abietinum* (3.8 ед/мл). По совокупности показателей экспресс-тестов, количественного определения ферментативной активности, ростовых параметров на лигноцеллюлозных субстратах и степени биоконверсии древесины наиболее перспективным продуцентом лигнолитических ферментов в условиях *in vitro* является штамм G14-16A *G. lucidum*; целлюлолитических ферментов – штамм Fr6-17 *F. pinicola*.

Ключевые слова: биодеструкция, ксилотрофы, базидиальные грибы, растительные субстраты, гидродинамическая активация, твердофазное и глубинное культивирование, целлюлазы, лигниназы.

Введение

Ксилотрофные базидиальные грибы обладают мощным биотехнологическим потенциалом и спо-

Литовка Юлия Александровна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, профессор кафедры химической технологии древесины и биотехнологии, тел. (391) 227-36-54, e-mail: litovkajul@rambler.ru

Павлов Игорь Николаевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией лесных культур, микологии и фитопатологии, заместитель директора по научной работе, заведующий кафедрой химической технологии древесины и биотехнологии, тел. (391) 227-36-54, e-mail: forester24@mail.ru

Окончание на С. 372.

собны осуществлять глубокую деградацию компонентов клеточных стенок ксилемы, включая лигнин – наиболее труднорастворимый растительный биополимер. В природе известны два основных пути разложения древесины – фитопатогенный и сапротрофный. Фитопатогенная деструкция интенсифицирует круговорот веществ в лесных экосистемах вследствие деятельности ксилотрофов на

* Автор, с которым следует вести переписку.

вегетирующих растениях, что существенно уменьшает продолжительность жизни деревьев и ускоряет поступление веществ древесины в «цепи разложения» лесных биогеоценозов. Эффективность деструкции древесных субстратов определяется действием ферментных систем грибов и зависит от их качественного и количественного состава. Деградация полисахаридов происходит под действием комплекса карбогидраз (целлюлазы и гемицеллюлазы); деструкция лигнина определяется наличием лигнолитической ферментной системы (лигнин-пероксидаза, марганец-зависимая пероксидаза, лакказы и др.) и комплексом вторичных метаболитов. Разнообразное сочетание ферментативных комплексов у дереворазрушающих базидиомицетов связано с их экологическими особенностями, трофической специализацией и является следствием длительной эволюции растений и грибов [1–4].

Эффективность гидролиза растительной биомассы характеризуется выраженной штаммовой и видовой вариабельностью несмотря на близкий состав внеклеточных ферментов у представители различных таксономических и экологических групп. Грибы бурой гнили (*Coniophora puteana* (Schumach.) P. Karst., *Fomitopsis palustris* (Berk. & M.A. Curtis) Gilb. & Ryvardeen, *F. pinicola* (Sw.) P. Karst., *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst., *Serpula lacrymans* (Wulfen) J. Schröt.) активно ферментируют разнообразные растительные субстраты при твердофазном и глубинном культивировании на фоне отсутствия лигнолитической активности, значительном снижении степени кристалличности целлюлозы (в 1.5–2 раза) и убыли массы субстрата, что свидетельствует об их способности к деградации целлюлозы без удаления лигнина [5–10].

Большинство грибов бурой гнили не обладают целлюлогидролазной активностью, разрушающей кристаллическую структуру целлюлозы, однако, на примере *C. puteana* и *F. palustris* (*Tyromyces palustris*) показана способность базидиомицетов генерировать перекисные радикалы, запускающие окислительный процесс деполимеризации целлюлозы [5, 11, 12]. Продуцентами внеклеточных карбоксигидраз также являются некоторые представители грибов белой гнили, эффективно использующие не только лигнин, но и полисахариды. Виды *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst. и *Fomes fomentarius* (L.) Fr. в равной степени деполимеризуют целлюлозу и гемицеллюлозы, *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. – преимущественно целлюлозу, *Pycnoporus coccineus* (син. *Trametes coccinea* (Fr.) Hai J. Li & S.H. He) полностью разрушает гемицеллюлозы. Перспективной культурой для осахаривания лигноцеллюлозной биомассы является вид *Phanerochaete chrysosporium* Burds., обладающий высокими показателями ферментов лигнолитического и целлюлолитического действия [13–16].

Максимальным содержанием окислительно-восстановительных ферментов характеризуются грибы белой гнили (наиболее эффективные деструкторы лигнина): *B. adusta*, *Dichomitus squalens* (P. Karst.) D.A. Reid, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr.), *P. chrysosporium*, *Phlebia brevispora* Nakasone, *P. radiata* Fr., *Pleurotus eryngii* (DC.) Quéf., *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Porodaedalea niemelaei* M. Fisch., *Porodaedalea pini* (Brot.) Murrill, *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilát, *T. versicolor* (L.) Lloyd. Лигнин является потенциально богатым энергетическим материалом, но не может служить единственным источником углерода и энергии. Деградация лигнина осуществляется на вторичном этапе метаболизма при истощении в ростовом субстрате доступных источников углеродного питания (целлюлоза, глюкоза). Для всех грибов белой гнили стимулирующее действие на скорость и глубину биодеградацию лигнинового полимера оказывает увеличение концентрации кислорода и регуляция кислотности среды [1, 2, 4, 9, 14–21].

Маколова Полина Васильевна – младший научный сотрудник лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии, e-mail: polinochka-makolova@rambler.ru

Тимофеев Антон Алексеевич – младший научный сотрудник лаборатории геномных исследований и биотехнологии, e-mail: timofeyev95@gmail.com

Литвинова Екатерина Алексеевна – ассистент кафедры химической технологии древесины и биотехнологии, младший научный сотрудник лаборатории геномных исследований и биотехнологии, e-mail: litvinovaek22@ya.ru

Васькина Анастасия Александровна – студент, e-mail: drgroptimusprime@gmail.com

Шабанов Александр Васильевич – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной спектроскопии, e-mail: alexch_syb@mail.ru

Продукты ферментации целлюлозной биомассы могут быть конвертированы в биотопливо (этанол, бутанол), органические и аминокислоты, кормовые продукты, адгезивные материалы, лекарственные препараты, биоразлагаемые пластики и другие целевые продукты. Лигниназы базидиальных грибов отличаются высоким окислительно-восстановительным потенциалом и широкой субстратной специфичностью, что открывает возможность их практического использования (производство древесноволокнистых плит; целлюлозно-бумажная, пищевая и текстильная промышленность; биоэлектроника). Некоторые виды грибов белой

гнили обладают механизмами детоксификации ксенобиотиков (гербициды, пестициды, красители, полициклические ароматические углеводороды), что определяет их востребованность в качестве перспективных продуцентов в технологиях биоконверсии и биоремедиации [1, 2, 4, 14, 15].

Основным препятствием по внедрению базидиальных грибов в промышленные технологии является низкие скорости роста мицелия и высокая степень контаминации ростовых субстратов конкурентной микрофлорой. Тем не менее внимание многочисленных исследователей сфокусировано именно на этой группе грибов, поскольку с развитием современных биотехнологий ксилотрофные базидиомицеты становятся все более доступным источником высокоактивных и стабильных экзогенных ферментов. Синтез мультиферментного дереворазрушающего комплекса во многом зависит не только от генетических и физиолого-биохимических особенностей продуцента, но и от ростового субстрата и условий культивирования. В связи с чем актуальной задачей является поиск и отбор быстрорастущих штаммов ксилотрофов с высоким выходом ферментов в различных биотехнологических системах. Сибирские штаммы базидиальных грибов отличаются высокой экологической пластичностью, широким температурным диапазоном и способностью колонизировать разнообразные отходы лесопромышленного и сельскохозяйственного комплексов. Психротолерантность и высокая дереворазрушающая активность сапротрофных и фитопатогенных видов позволяют рассматривать представителей сибирских популяций базидиомицетов как потенциальных продуцентов ферментов для эффективной биодegradации растительных отходов.

Экспериментальная часть

Объектом исследования служили сибирские штаммы макроскопических грибов (пять родов, десять видов): Ab5-17 *Armillaria borealis* Marxm. & Korhonen; Ga1-15 *Ganoderma lipsiense* (Batsch) G.F. Atk. (син. *Ganoderma applanatum*); Gl4-16A *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.; Gt2-16X *Ganoderma tsugae* Murrill; Fp6-17 *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst.; Hp8 *Heterobasidion abietinum* Niemelä & Korhonen; K-Ha4 *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.; Pl-15 *Porodaedalea laricis* (Jacz. ex Pilát) Niemelä; Pp-16 *Porodaedalea pini* (Brot.) Murrill; Pn-13 *Porodaedalea niemelaei* M. Fisch. Штаммы были изолированы в чистую культуру из соответствующих базидиом, произраставших на живой и сухостойной древесине хвойных и лиственных пород, методом накопления во влажной камере с последующим пересевом на агаризованные среды [22]. Культуральные особенности исследовали на натуральных питательных средах (морковный агар, мальт-экстракт агар) при 25 ± 1 °C (рис. 1А); микроструктуры – методами светопольной микроскопии (Nikon Eclipse Ci, Япония) в микрокамерах [22] и сканирующей электронной микроскопии (Hitachi SU3500, Япония) [23] (рис. 1Б). Видовую идентификацию подтверждали секвенированием участков генетических маркеров ITS и TEF-1alpha с использованием оборудования ЦКП «Инновационные технологии защиты растений» ВИЗР (Санкт-Петербург-Пушкин) и ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

Индексы общей ферментативной активности определяли экспресс-методом на агаризованных питательных средах: среда Чапека-Докс с 1% Na-КМЦ с использованием красителя конго-красный (индекс целлюлазной активности) [24] и мальт-экстракт агар с 0.5% танина (индекс оксидазной активности по Бавендамму) [22]. Твердофазное культивирование осуществляли на двух типах растительных субстратов: 1. опилки *Abies sibirica*, *Larix sibirica*, *Pinus sibirica*, *Pinus sylvestris*, *Populus tremula* и *Betula L.*, высушенные до воздушно-сухого состояния и проходящие через сито с отверстием 3 мм; 2. растительная масса (хвоя пихты и опилки березы) после гидродинамической обработки с добавлением щепы и опилок осины (соотношение 3 : 1 : 1). Влажность субстратов 70%; температура 25 ± 1 °C; длительность 10–21 сут. На всех субстратах определяли ростовые параметры грибов (радиальная скорость роста, СР; ростовой коэффициент, РК) [25]; на опилках *A. sibirica* исследовали химический состав до и после биодеструкции [26].

Активность фенолоксидазы исследовали при твердофазном и глубинном культивировании грибов, используя модифицированный метод Бояркина [27]: спектрофотометрически (590 нм) по развитию окраски в окислительно-восстановительных реакциях, сопряженных с окислением фенолов в системе пирокатехин-р-фенилендиамин. Активность карбоксиметилцеллюлазы (КМЦ-аза) и ксиланазы определяли при глубинном культивировании методом Нельсона-Шомоди: спектрофотометрически (610 нм) по скорости образования восстанавливающих сахаров при ферментативном гидролизе натриевой соли КМЦ и березового ксилана, образующихся за 1 мин при 50 °C и pH 5.0 [28]. Содержание белка в культуральной жидкости оценивали по методу Бредфорд [29].

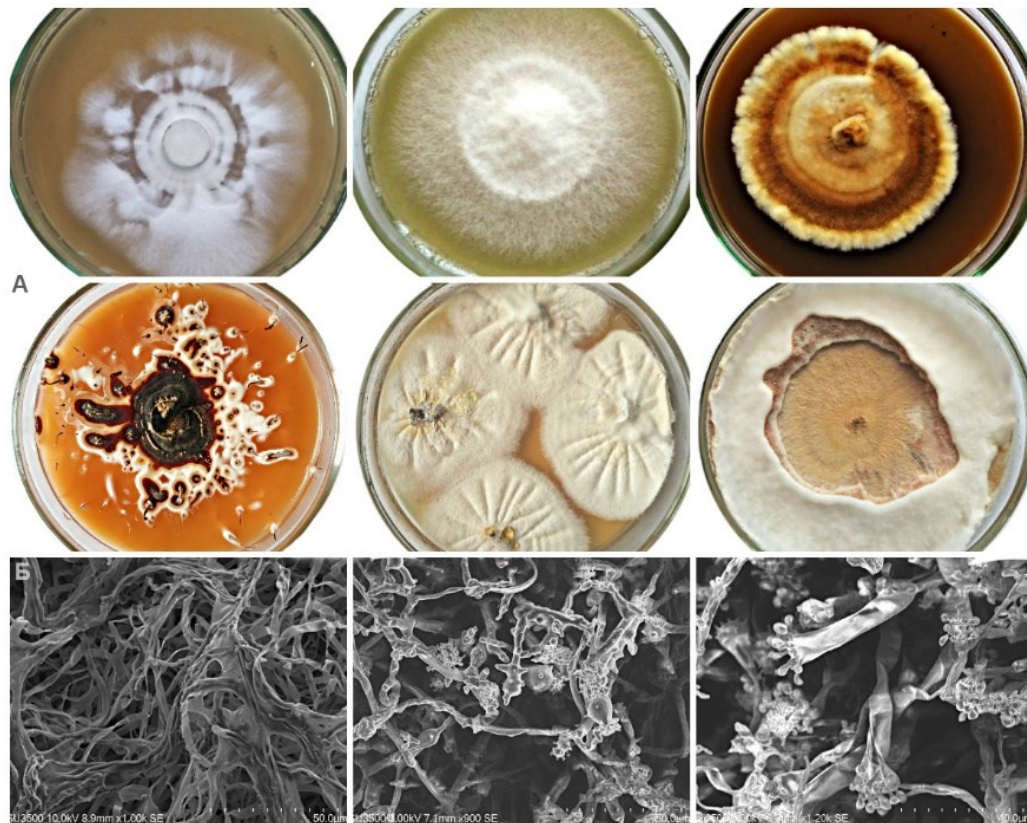


Рис. 1. Морфология колоний на агаризованных средах (А) и микроструктур (Б; увеличение $\times 900$ – 1200) сибирских штаммов базидиальных грибов: А: слева направо сверху вниз: *Ganoderma tsuga*, *Fomitopsis pinicola*, *Porodaedalea pini*, *Armillaria borealis*, *Ganoderma lucidum*, *Heterobasidion annosum*; Б: *Armillaria borealis*, *Ganoderma lucidum*, *Heterobasidion annosum*

Глубинное культивирование осуществляли в термостатируемом шейкер-инкубаторе (BIORUS DS 2012, Китай) в колбах Эрленмейера объёмом 250 мл на трех типах питательных средах: 1. Для определения фенолоксидазы (г/л): глюкоза – 10.0; пептон – 3.0; KH_2PO_4 – 0.6; K_2HPO_4 – 0.4; MgSO_4 – 0.5; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.0005; вода водопроводная. В качестве индуктора использовали $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.15 г/л). Режим культивирования: 180 об. \cdot мин $^{-1}$; 25 °С; pH 6.0; 5 сут. 2. Для определения КМЦ-зы и ксиланазы (модифицированная среда Норкранс, г/л): глюкоза – 1, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ – 1, KH_2PO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, микрокристаллическая целлюлоза / ксилан – 5; $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ – 5 мг, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 4.4 мг, MnSO_4 – 5 мг, CaCl_2 – 55.5 мг, витамин В₁ – 40 мг. Режим культивирования: 200 об. \cdot мин $^{-1}$; 25 °С; pH 5.0; 5 сут. 3. Среда на основе растительной массы после гидродинамической обработки: хвоя пихты (5 г), опилки березы (10 г), вода (150 мл). Режим культивирования: 200 об. \cdot мин $^{-1}$; 25 °С; pH 5.0; 5 сут). Механоактивацию растительного сырья проводили на кавитационном гидроударном диспергаторе (радиус ротора 277 мм, частота вращения 3000 об./мин, длительность в водной среде 30 мин).

Обсуждение результатов

Исследование ростовых параметров сибирских штаммов базидиальных грибов *in vitro* на агаризованных средах позволило установить, что максимальными показателями на мальт-экстракт агаре характеризуются штаммы *Ganoderma lucidum* и *Fomitopsis pinicola*: скорость роста (СР) составила 6.7 и 5.6 мм/сут соответственно; ростовой коэффициент (РК) – 103 и 115. Скорость роста остальных культур варьировала в пределах 0.5–3.2 мм/сут; ростовой коэффициент – от 25 до 55. При добавлении в среду 0.5% танина (оксидазный экспресс-тест) (табл. 1, рис. 2) наибольшие показатели роста отмечены также у штаммов *G. lucidum* и *F. pinicola* (СР 5,8 и 4,8 мм/сут; РК 65 и 87), однако оксидазный индекс, характеризующий активность лигнолитических ферментов, был максимальным у *Ganoderma tsugae* и *Armillaria borealis* (8.4 и 7.6).

Таблица 1. Ростовые параметры и индексы ферментативной активности сибирских штаммов базидиомицетов на агаризованных питательных средах

| Вид | Мальт-экстракт агар | Мальт-экстракт агар с 0.5% танина | | Среда Чапека-Докс с 1% Na-КМЦ | |
|---------------------------------|---------------------|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | Ростовые параметры | Индекс оксидазной активности | Ростовые параметры | Индекс целлюлазной активности |
| <i>Armillaria borealis</i> | 0.5±0.04 н.о. | 0.3±0.02 н.о. | 7.6±0.04 | 0.2±0.01 н.о. | 4.6±0.05 |
| <i>Ganoderma lipsiense</i> | 2.9±0.09* 52** | 2.7±5.6 0.11 25 | 4.2±0.22 | 1.3±0.02 16 | 2.9±0.02 |
| <i>Ganoderma lucidum</i> | 6.7±0.42 103 | 5.8±0.17 69 | 6.2±0.08 | 2.4±0.09 46 | 3.9±0.02 |
| <i>Ganoderma tsugae</i> | 2.5±0.71 49 | 2.2±0.30 23 | 8.4±0.08 | 1.2±0.08 15 | 3.7±0.00 |
| <i>Fomitopsis pinicola</i> | 5.6±0.8 115 | 4.8±0.11 87 | 0.0±0.00 | 3.7±0.1 59 | 5.4±0.04 |
| <i>Heterobasidion abietinum</i> | 3.0±0.10 51 | 2.4±0.71 33 | 5.5±0.24 | 1.4±0.02 15 | 3.2±0.01 |
| <i>Heterobasidion annosum</i> | 3.2±0.08 55 | 2.8±0.71 38 | 4.7±0.12 | 1.7±0.03 19 | 3.7±0.04 |
| <i>Porodaedalea laricis</i> | 1.7±0.00 29 | 1.4±0.02 22 | 4.1±0.08 | 0.3±0.00 8 | 1.9±0.01 |
| <i>Porodaedalea pini</i> | 1.4±0.01 26 | 1.0±0.01 20 | 4.2±0.10 | 0.4±0.01 7 | 2.0±0.04 |
| <i>Porodaedalea niemelaei</i> | 1.5±0.01 25 | 0.8±0.01 18 | 6.0±0.09 | 0.2±0.00 6 | 1.7±0.01 |

*скорость роста (мм / сут); **ростовой коэффициент.

Высокие индексы отмечены также у *G. lucidum*, *Porodaedalea niemelaei* и *Heterobasidion abietinum* (6.2; 6.0 и 5.5 соответственно; штамм *F. pinicola* не проявлял лигнолитической активности; остальные культуры характеризовались умеренными показателями (индекс 4.1–4.7). Культивирование на модифицированной среде Чапека-Докс с 1% Na-КМЦ (целлюлазный экспресс-тест) выявило два штамма с высоким индексом целлюлазной активности – *F. pinicola* и *A. borealis* (5.4 и 4.6 соответственно), однако ростовые показатели были максимальными только у *F. pinicola*: скорость роста 3.7 мм/сут, ростовой коэффициент 59. Относительно высокие параметры отмечены также у штамма *G. lucidum*: скорость роста 2.4 мм/сут; ростовой коэффициент 45; целлюлазный индекс 3.9. Остальные исследуемые культуры характеризовались низкими ростовыми показателями (СР 0.2–1.7 мм/сут; РК 6–19) и умеренным целлюлазным индексом – от 1.7 до 3.7.

Все исследуемые штаммы базидиомицетов в условиях твердофазного культивирования колонизировали растительные моноsubstrаты на основе опилок хвойных и лиственных пород (табл. 2; рис. 3А). Скорость роста на хвойных substrатах варьировала в пределах 0.4–3.8 мм/сут, значения ростового коэффициента – от 8 до 38; на лиственных substrатах скорость роста составила 0.5–3 мм/сут, ростовой коэффициент – 4–30. Максимальные ростовые параметры отмечены для штаммов *G. lucidum* (на всех опилочных substrатах) и *F. pinicola* (на хвойных substrатах): скорость роста – 3.0–3.2 и 3.3–3.8 мм/сут соответственно; ростовой коэффициент – 30–36 и 34–38. В целом, по совокупности ростовых параметров на питательных средах и растительных substrатах исследуемые базидиальные грибы были отнесены к трем условным группам: 1 Быстрорастущие – *F. pinicola* и *G. lucidum* (РК на МЭА более 100; РК на средах с танином и Na-КМЦ – более 45; РК на растительных substrатах – более 30); 2 Умеренно растущие – *G. lipsiense*, *G. tsugae*, *H. abietinum*, *H. annosum* (РК на МЭА более 50; РК на средах с танином и Na-КМЦ – более 15; РК на растительных substrатах – более 20); 3. Медленно растущие – *P. laricis*, *P. pini*, *P. niemelaei* (РК на МЭА более 20; РК на средах с танином и Na-КМЦ – более 5; РК на растительных substrатах – более 5), а также *A. borealis* (по низким показателям СР; РК не определяли в силу морфологических особенностей колонии). С учетом показателей энзимных экспресс-тестов и ростовых параметров на лигноцеллюлозных substrатах, наиболее перспективным продуцентом лигнолитических ферментов является штамм G14-16А *G. lucidum*; целлюлолитических ферментов – штамм Fp6-17 *F. pinicola*.

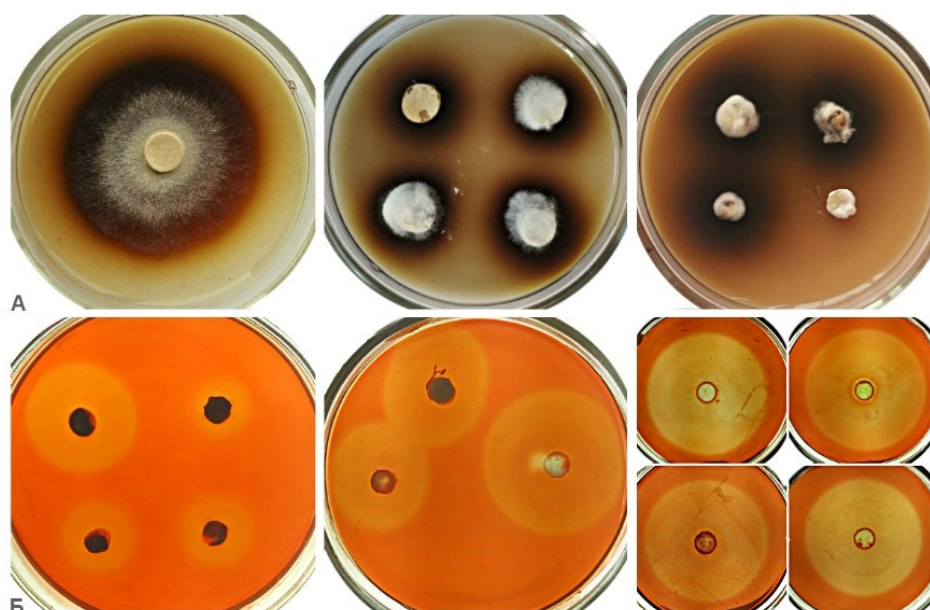


Рис. 2. Экспресс-метод определения индексов общей оксидазной активности по Бавендамму (А) и целлюлазной активности с конго-красным (Б)

Таблица 2. Ростовые параметры сибирских штаммов базидиомицетов на опилочных растительных субстратах

| Штамм, вид | Хвойные породы | | | | Лиственные породы | |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|------------------|
| | <i>Abies sibirica</i> | <i>Larix sibirica</i> | <i>Pinus sylvestris</i> | <i>Pinus sibirica</i> | <i>Populus tremula</i> | <i>Betula L.</i> |
| <i>Armillaria borealis</i> | 0.7±0.02 | 0.4±0.02 | 1.3±0.24 | 0.9±0.06 | 0.5±0.01 | 0.6±0.02 |
| <i>Ganoderma lipsiense</i> | 2.7±0.10* | 2.8±0.02 | 2.9±0.12 | 3.0±0.00 | 2.9±0.14 | 2.9±0.02 |
| | 30** | 28 | 30 | 30 | 28 | 28 |
| <i>Ganoderma lucidum</i> | 3.1±0.08 | 3.2±0.22 | 3.1±0.12 | 3.2±0.10 | 3.1±0.00 | 3.1±0.02 |
| | 34 | 35 | 34 | 36 | 32 | 32 |
| <i>Ganoderma tsugae</i> | 1.6±0.24 | 1.7±0.44 | 2.2±0.12 | 2.1±0.12 | 1.9±0.12 | 1.7±0.18 |
| | 24 | 28 | 30 | 30 | 28 | 28 |
| <i>Fomitopsis pinicola</i> | 3.7±0.01 | 3.3±0.02 | 3.8±0.09 | 3.8±0.10 | 2.6±0.02 | 2.9±0.02 |
| | 36 | 34 | 38 | 38 | 24 | 26 |
| <i>Heterobasidion abietinum</i> | 1.7±0.20 | 1.8±0.22 | 2.6±0.12 | 2.4±0.08 | 1.8±0.14 | 1.7±0.20 |
| | 22 | 26 | 36 | 32 | 28 | 20 |
| <i>Heterobasidion annosum</i> | 1.8±0.24 | 1.7±0.24 | 2.8±0.16 | 2.5±0.16 | 1.7±0.12 | 1.5±0.18 |
| | 24 | 28 | 38 | 34 | 24 | 26 |
| <i>Porodaedalea laricis</i> | 1.2±0.02 | 1.4±0.06 | 1.1±0.04 | 1.2±0.04 | 1.2±0.02 | 1.4±0.06 |
| | 8 | 12 | 8 | 8 | 4 | 6 |
| <i>Porodaedalea pini</i> | 1.2±0.02 | 1.1±0.01 | 1.4±0.01 | 1.3±0.02 | 1.2±0.02 | 1.1±0.00 |
| | 8 | 8 | 14 | 12 | 6 | 4 |
| <i>Porodaedalea niemelaei</i> | 1.1±0.02 | 1.3±0.01 | 1.4±0.01 | 1.2±0.01 | 1.2±0.04 | 1.3±0.03 |
| | 8 | 12 | 16 | 8 | 6 | 6 |

*скорость роста (мм / сут); **ростовой коэффициент.

Для исследования степени биоконверсии лигно-углеводного комплекса древесины использовали измельченные опилки *A. sibirica* до и после твердофазного культивирования всех исследуемых штаммов базидиомицетов. Результаты определения химического состава исходного сырья показали, что древесина пихты сибирской является перспективным ростовым субстратом для ксилотрофных грибов (табл. 3): на долю лигно-углеводного комплекса приходится 92.5% от общего количества абсолютно сухого субстрата; сумма полисахаридов составляет 59.4% (легкогидролизуемые полисахариды (ЛГП) – 16.8%, трудногидролизуемые полисахариды (ТГП) – 42.6%; негидролизуемый остаток, включая лигниновые вещества – 33.1%.

При твердофазной ферментации опилок *A. sibirica* отмечена различная дереворазрушающая активность исследуемых грибов. Наиболее эффективными биодеструкторами оказались штаммы *A. borealis*, *G. tsugae*, *G. lucidum*, *F. pinicola* и *P. niemelaei* – убыль массы растительного субстрата составила от 8 до 11%. Для всех исследуемых штаммов отмечена общая тенденция снижения количества полисахаридов (в 1.2–1.4 раза), в большей степени за счет ферментализации трудногидролизуемой фракции, особенно у *A. borealis*, *G. tsugae*, *G. lucidum* и *F. pinicola* (в 1.5 раза). Для *A. borealis*, *G. tsugae* и *P. niemelaei* отмечено также уменьшение концентрации лигниновых веществ в 1.2 раза по сравнению с исходным субстратом; при культивировании остальных штаммов содержание лигниновых веществ изменилось не существенно либо осталось на прежнем уровне (*F. pinicola*).

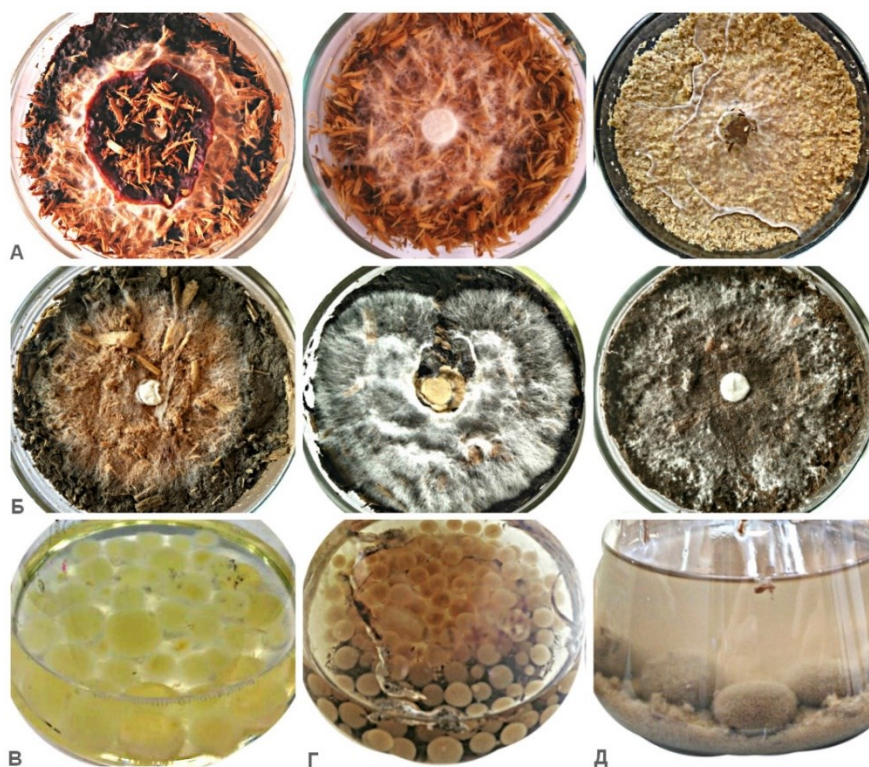


Рис. 3. Твердофазное (А, Б) и глубинное (В, Д) культивирование сибирских штаммов ксилотрофов. А: колонизация растительных субстратов без предобработки (*A. borealis*, *H. annosum*, *P. niemelaei*); Б: колонизация хвой пихты после гидродинамической обработки (*G. tsuga*, *F. pinicola*, *H. abietinum*); В, Г: формирование глубинных пеллет на целлюлозосодержащей среде Норкранс (*G. lipsiense*, *G. lucidum*); Д: формирование глубинных пеллет на кавитированном растительном сырье (*F. pinicola*)

Таблица 3. Химический состав древесины *Abies sibirica* до и после биодеструкции сибирскими штаммами базидиальных грибов

| Наименование показателей | Содержание, % а.с.с. с учетом убыли массы образца | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| | исходный субстрат | Субстрат после биодеструкции грибами | | | | | | | | | |
| | | <i>Armillaria borealis</i> | <i>Ganoderma lipsiense</i> | <i>Ganoderma lucidum</i> | <i>Ganoderma tsugae</i> | <i>Fomitopsis pinicola</i> | <i>Heterobasidium abietinum</i> | <i>Heterobasidium annosum</i> | <i>Porodaedalea laricis</i> | <i>Porodaedalea pini</i> | <i>Porodaedalea niemelaei</i> |
| ЛГП | 16.8 | 14.9 | 16.1 | 15.9 | 15.7 | 14.8 | 13.9 | 16.3 | 16.2 | 16.0 | 15.3 |
| ТГП | 42.6 | 29.0 | 34.9 | 27.8 | 29.9 | 27.6 | 34.2 | 32.5 | 35.1 | 34.8 | 31.8 |
| Сумма полисахаридов | 59.4 | 43.9 | 51.0 | 43.7 | 45.6 | 42.4 | 48.1 | 48.8 | 51.3 | 50.8 | 47.1 |
| Негидролизуемый остаток | 33.1 | 29.3 | 31.7 | 30.1 | 29.1 | 33.7 | 31.1 | 31.5 | 31.7 | 31.1 | 29.2 |
| Лигноуглеводный комплекс | 92.5 | 73.2 | 82.7 | 73.8 | 74.7 | 76.1 | 79.2 | 80.3 | 83.0 | 81.9 | 76.3 |
| Убыль массы, % | – | 11.3 | 6.1 | 10.5 | 11.1 | 9.1 | 5.7 | 4.9 | 5.1 | 4.2 | 8.1 |

Дереворазрушающая способность грибов обусловлена в первую очередь наличием и активностью соответствующих ферментных систем, а также условиями культивирования и наличием индуцирующих веществ. Активность фенолоксидазы исследовали в условиях твердофазного и глубинного культивирования, данные представлены на рисунке 4.

Максимальная активность фермента отмечена при твердофазном культивировании (при наличии в среде нативного индуктора), а также глубинном культивировании с добавлением индуктора: показатели составили 0.42–0.75 и 0.43–1.21 ед/г·с соответственно. Штаммы *A.borealis*, *H.abietinum* и *P.niemelaei* оказались наиболее активными при твердофазной ферментации растительного субстрата – фенолоксидазная активность составила 0.74; 0.61 и 0.69 ед/г·с соответственно. Штаммы *G.lipsiense*, *G.lucidum* и *G.tsugae* проявляли максимальную активность при глубинном культивировании с индуктором – 0.67; 0.79 и 1.21 ед/г·с. Показатели ферментативной активности остальных исследуемых культур существенно не отличались в зависимости от способа культивирования. Максимальная фенолоксидазная активность отмечена у *G.tsugae* (1.2 ед/г·с); высокие показатели – у штаммов *A.borealis*, *G.lucidum*, *P.niemelaei* и *G.lipsiense* (0.7–0.8 ед/г·с); у *F.pinicola* активность фермента не выявлена.

Активность карбоксиметилцеллюлазы (КМЦ-зы) и ксиланазы исследовали в условиях глубинного культивирования грибов с добавлением соответствующего индуктора (Na-КМЦ, березовый ксилан) (рис. 5). Максимальной активностью КМЦ-зы характеризуются штаммы *F.pinicola* и *G.lucidum* – 11.8 и 10.3 ед/мл соответственно; высокие показатели отмечены также у *G.tsugae*, *H.annosum* и *A.borealis* (9.4; 8.8 и 8.2 ед/мл). Ксиланазная активность в большей степени выражена у штаммов *H.abietinum* (3,8 ед/мл); высокие значения также у *G.lucidum*, *G.tsugae* и *F.pinicola* (3–3.2 ед/мл). Концентрация внеклеточного белка варьировала в пределах 0.5–0.9 мг/мл. Максимальными показателями характеризуется штамм *F.pinicola* (0.9 мг/мл); высокие значения также у *G.tsugae*, *H.abietinum* (0.7 мг/мл) и *G.lucidum* (0.6 мг/мл), что согласуется с показателями ферментативной активности.

Известно, что предварительная гидродинамическая обработка растительного сырья приводит к изменению его гранулометрического состава и физико-химических свойств (уменьшение размера частиц, деформирование волокон, частичное разрушение клеточных стенок, увеличение доли легкогидролизуемых полисахаридов), что может существенно увеличить степень его доступности для микробиологической конверсии. Для исследования такой возможности осуществили твердофазное культивирование ксилотрофных базидиомицетов на растительном сырье (хвоя пихты и опилки березы) после гидродинамической обработки с добавлением щепы и опилок осины (соотношение 3 : 1 : 1). Все исследуемые штаммы грибов колонизировали активированные субстраты с различными ростовыми показателями (табл. 4). На хвое *A.sibirica* радиальная скорость роста варьировала в пределах 0.2–3.8 мм/сут; ростовой коэффициент изменялся от 22 до 56. На опилках *Betula* L. скорость роста составила 0.4–3.6 мм/сут; ростовой коэффициент – 14–38. Быстрорастущими на обоих субстратах являются штаммы *G.lucidum* и *F.pinicola*; умеренно растущими – *H.abietinum*, *H.annosum* и *G.lipsiense*.

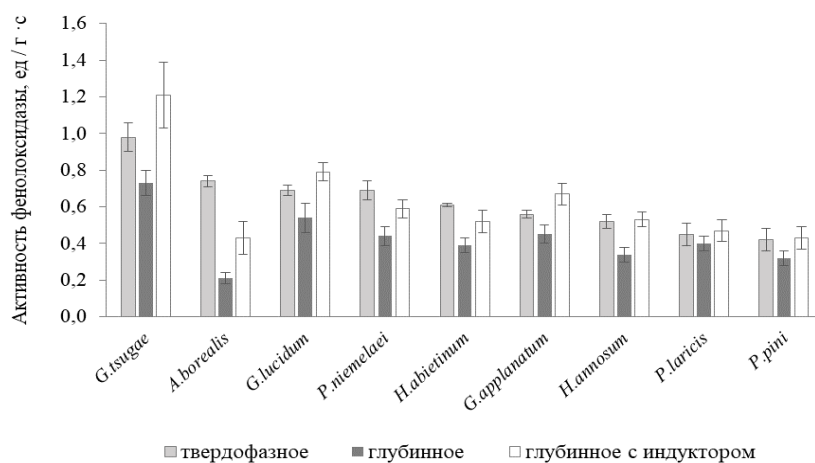


Рис. 4. Активность фенолоксидазы (ед/г·с) ксилотрофных базидиомицетов при различных способах культивирования

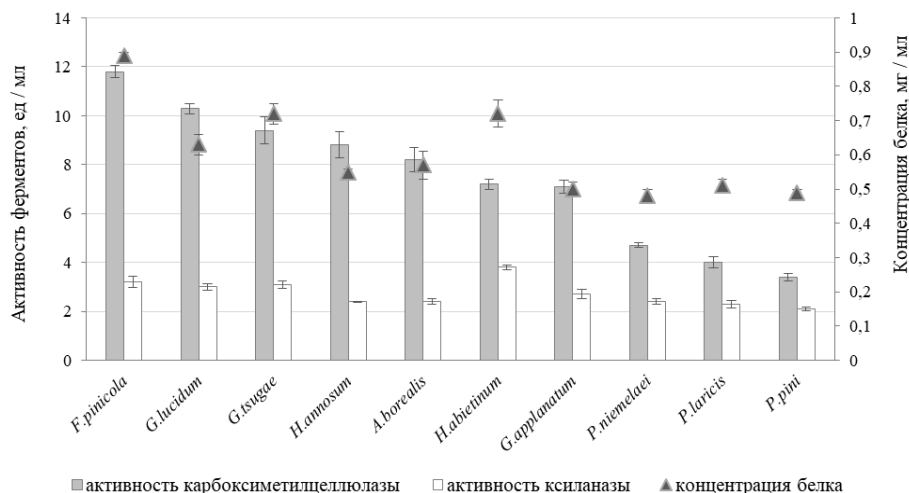


Рис. 5. Активность ферментов и содержание белка в культуральной жидкости базидиальных грибов при глубинном культивировании

Таблица 4. Ростовые параметры сибирских штаммов базидиомицетов на гидродинамически активированных субстратах с обогащением исходным растительным сырьем

| Штамм, вид | Растительная масса после гидродинамической обработки | | Без обработки |
|---------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
| | хвоя <i>Abies sibirica</i> | опилки <i>Betula L.</i> | опилки <i>Betula L.</i> |
| <i>Armillaria borealis</i> | 0.2±0.01 | 0.3±0.02 | 0.6±0.02 |
| <i>Ganoderma lipsiense</i> | <u>2.0±0.22</u> | <u>2.2±0.18</u> | <u>2.9±0.02</u> |
| | 36 | 30 | 28 |
| <i>Ganoderma lucidum</i> | <u>3.6±0.18</u> | <u>3.5±0.12</u> | <u>3.1±0.02</u> |
| | 52 | 38 | 32 |
| <i>Ganoderma tsugae</i> | <u>1.1±0.24</u> | <u>1.5±0.08</u> | <u>1.7±0.18</u> |
| | 28 | 22 | 28 |
| <i>Fomitopsis pinicola</i> | <u>3.8±0.12</u> | <u>3.6±0.22</u> | <u>2.9±0.02</u> |
| | 56 | 34 | 26 |
| <i>Heterobasidion abietinum</i> | <u>2.0±0.44</u> | <u>1.8±0.22</u> | <u>1.7±0.20</u> |
| | 36 | 28 | 20 |
| <i>Heterobasidion annosum</i> | <u>2.1±0.22</u> | <u>2.0±0.09</u> | <u>1.5±0.18</u> |
| | 38 | 30 | 26 |
| <i>Porodaedalea laricis</i> | <u>0.8±0.01</u> | <u>0.9±0.02</u> | <u>1.4±0.06</u> |
| | 22 | 16 | 6 |
| <i>Porodaedalea pini</i> | <u>1.1±0.02</u> | <u>0.9±0.01</u> | <u>1.1±0.00</u> |
| | 24 | 16 | 4 |
| <i>Porodaedalea niemelaei</i> | <u>1.0±0.01</u> | <u>1.2±0.01</u> | <u>1.3±0.03</u> |
| | 22 | 14 | 6 |

*скорость роста (мм / сут); **ростовой коэффициент.

При сравнении ростовых показателей грибов на активированных и исходных опилках березы все штаммы были отнесены к трем группам, у которых: 1 – ростовые показатели увеличивались на гидродинамически активированных опилках (*G. lucidum*, *F. pinicola*, *H. annosum*); 2 – ростовые показатели замедлялись (*A.borealis*, *G.lipsiense*, *P. laricis*); 3 – ростовые показатели существенно не различались (*G. tsugae*, *H. abietinum*, *P.pini*, *P.niemelaei*). Полученные данные свидетельствуют о неоднозначной ростовой реакции исследуемых грибов на предварительную гидродинамическую активацию березовых опилок, что, вероятно, связано с особенностями их ферментных систем, субстратной специфичностью и требует дополнительного исследования. В предварительном эксперименте по глубинному культивированию наиболее активного штамма (*F. pinicola*) на среде с растительной массой после гидродинамической обработки (хвоя пихты и опилки березы) отмечено формирование крупных эллипсоидных и мелких сферических пеллет (рис. 3Д). Выход сухой биомассы составил 12,8 г/л; активность КМЦ-зы на пятые сутки культивирования – 8.4 ед/мл.

Таким образом, по совокупности ростовых параметров на целлюлозо- и танинсодержащих питательных средах, растительных субстратах (исходных и гидродинамически активированных), а также ферментативной активности (КМЦ-за, ксиланаза, фенолоксидаза) и степени биоконверсии древесины наиболее перспективными биодеструкторами являются штаммы базидиальных грибов *F. pinicola* и *G. lucidum*. Наряду с выраженными дереворазрушающими свойствами эти культуры обладают высокими ростовыми показателями при различных способах культивирования, не характерными для большинства ксилотрофных грибов в условиях *in vitro*.

Заключение

Сибирские штаммы базидиальных грибов с различной скоростью колонизируют целлюлозо- и танинсодержащие среды, а также хвойные и лиственные растительные отходы: радиальная скорость роста варьирует в пределах 0.2–5.8 мм/сут; ростовой коэффициент – от 4 до 87. В группу быстрорастущих ксилотрофов отнесены штаммы *F. pinicola* и *G. lucidum* (РК на МЭА более 100; РК на средах с танином и Na-КМЦ – более 45; РК на растительных субстратах – более 30). Максимальная дереворазрушающая активность на древесине *A. sibirica* характерна для видов *A. borealis*, *G. tsugae*, *G. lucidum*, *F. pinicola* и *P. niemelaei*: убыль массы субстрата составила 8–11%; сумма полисахаридов уменьшилась в среднем в 1.4 раза; содержание лигниновых веществ уменьшилось в 1.2 раза (под воздействием *A. borealis*, *G. tsugae* и *P. niemelaei*).

Высокие показатели ферментативной активности грибов отмечены при твердофазном и глубинном культивировании с добавлением индуктора. Максимальная активность фенолоксидазы характерна для *G. tsugae* (1.2 ед/г·с); высокая – для *A. borealis*, *G. lucidum*, *P. niemelaei* и *G. lipsiense* (0.7 ед/г·с). Максимальной активностью КМЦ-зы характеризуются штаммы *F. pinicola* и *G. lucidum* (11.8 и 10.3 ед/мл соответственно); ксиланазная активность в большей степени выражена у штаммов *H. abietinum* (3.8 ед/мл).

Все исследуемые ксилотрофы способны колонизировать гидродинамически активированные опилки *Betula L.* и хвою *A. sibirica*: радиальная скорость роста составила 0.2–3.8 мм/сут; ростовой коэффициент 14–56; максимальные ростовые параметры характерны для *G. lucidum* и *F. pinicola*. Штаммы проявляют различную ростовую реакцию отклика на предварительную активацию березовых опилок (ускорение роста / замедление роста / индифферентность), что требует дополнительного исследования.

С учетом показателей энзимных экспресс-тестов, количественного определения ферментативной активности, высоких ростовых параметров на лигноцеллюлозных субстратах, включая гидродинамически активированное сырье, и степени биоконверсии древесины пихты сибирской наиболее перспективным продуцентом лигнолитических ферментов в условиях *in vitro* является штамм G14-16A *G. lucidum*; целлюлолитических ферментов – штамм Fr6-17 *F. pinicola*.

Список литературы

1. Куликова Н.А., Кляйн О.И., Степанова Е.В., Королёва О.В. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. №6. С. 619–634.
2. Фёдорова Т.В., Шахова Н.В., Кляйн О.И., Глазунова О.А., Малошенок Л.Г., Куликова Н.А., Псурцева Н.В., Королёва О.В. Сравнительный анализ лигнолитического потенциала базидиальных грибов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. №6. С. 570–579.
3. Мухин В.А., Веселкин Д.В., Брындина Е.В. Основные закономерности современного этапа эволюции микобиоты лесных сообществ // Грибные сообщества лесных экосистем. М.; Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2000. С. 26–36.
4. Baldrian P. Enzymes of saprotrophic basidiomycetes // British Mycological Society Symposia Series. 2008. Vol. 28. Pp. 19–41.
5. Yoon J.J., Kim Y.K. Degradation of crystalline cellulose by the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* // J. Microbiol. 2005. Vol. 43 (6). Pp. 487–492.
6. Yoon J.J., Cha C.J., Kim Y.S., Kim W. Degradation of cellulose by the major endoglucanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola* // Biotechnol Lett. 2008. Vol. 30 (8). Pp. 1373–1378.
7. Литовка Ю.А., Павлов И.Н., Рязанова Т.В., Газизулина А.В., Чупрова Н.А. Дереворазрушающие свойства сибирских штаммов *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. // Химия растительного сырья. 2018. № 1. С. 193–199. DOI: 10.14258/jcprm.2018012729.
8. Shin K., Kim Y.H., Jeya M., Lee J.K., Kim Y.S. Purification and characterization of a thermostable cellobiohydrolase from *Fomitopsis pinicola* // Journal of microbiology and biotechnology. 2010. Vol. 20 (12). Pp. 1681–1688.

9. Machuca A., Ferraz A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white-and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium // *Enzyme and Microbial Technology*. 2001. Vol. 29 (6). Pp. 386–391.
10. Valášková V., Baldrian P. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* – production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases // *Microbiology*. 2006. Vol. 152 (12). Pp. 3613–3622.
11. Hastrup A.C., Howell C., Larsen F.H., Sathitsuksanoh N., Goodell B., Jellison J. Differences in crystalline cellulose modification due to degradation by brown and white rot fungi // *Fungal Biol*. 2012. Vol. 116 (10). Pp. 1052–1063.
12. Kim Y.S., Wi S.G., Lee K.H., Singh A.P. Cytochemical localization of hydrogen peroxide production during wood decay by brown-rot fungi *Tyromyces palustris* and *Coniophora puteana* // *Holzforschung*. 2002. Vol. 56 (1). Pp. 7–12.
13. Quiroz-Castaeda R.E., Balcazar-Lopez E., Dantan-Gonzalez E., Martinez A., Folch-Mallol J., Anaya C.M. Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium // *Electron J Biotechnol*. 2009. Vol. 12. Pp. 1–8.
14. Salvachúa D., Prieto A., López-Abelairas M., Lu-Chau T., Martínez Á. T., Martínez M.J. Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw // *Bioresource technology*. 2011. Vol. 102 (16). Pp. 7500–7506.
15. Saha B.C., Kennedy G.J., Qureshi N., Cotta M.A. Biological pretreatment of corn stover with *Phlebia brevispora* NRRL-13108 for enhanced enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production // *Biotechnology Progress*. 2017. Vol. 33(2). Pp. 365–374.
16. Govumoni S.P., Gentela J., Koti S., Haragopal V., Venkateshwar S., Rao L.V. Extracellular lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* (MTCC 787) under solid-state fermentation of agro wastes // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2015. Vol. 4(10). Pp. 700–710.
17. Montoya S., Sanchez O.J., Levin L. Production of lignocellulolytic enzymes from three white-rot fungi by solid-state fermentation and mathematical modeling // *African Journal of Biotechnology*. 2015. Vol. 14 (15). Pp. 1304–1317.
18. Elisashvili V., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Khardziani T., Agathos S.N. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia // *World J Microbiol Biotechnol*. 2009. Vol. 25(2). Pp. 331–339.
19. Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Kharziani T., Kvesitadze G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition // *Bioresource Technology*. 2008. Vol. 99. N3. Pp. 457–462.
20. Jaana K., Miia M.R., Jarkko I., Ilona O., Taina L. Lignocellulose-converting enzyme activity profiles correlate with molecular systematics and phylogeny grouping in the incoherent genus *Phlebia* (Polyporales, Basidiomycota) // *BMC Microbiology*. 2015. Vol. 15(217). Pp. 1–18.
21. Pavlov I.N., Litovka Yu.A., Ryazanova T.V., Chuprova N.A., Litvinova E. A., Putintseva Y.A., Kües U., Krutovsky K.V. Phylogenetic Relationships, Pathogenic Traits, and Wood-Destroying Properties of *Porodaedalea niemelaei* M. Fischer Isolated in the Northern Forest Limit of *Larix gmelinii* Open Woodlands in the Permafrost Area // *J. Sib. Fed. Univ. Biol*. 2018. Vol. 11, no. 1. Pp. 30–48. DOI: 10.17516/1997-1389-0039.
22. Методы экспериментальной микологии / под ред. В.И. Билай. Киев, 1982. 550 с.
23. Alves E., Lucas G.C., Pozza E.A., Alves M.de C. Scanning Electron Microscopy for Fungal Sample Examination // *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology*. Springer Science + Business Media, LLC, 2013. Pp. 133–150.
24. Bradner J.R., Gillings M., Nevalainen K.M.H. Qualitative assessment of hydrolytic activities in antarctic microfungi grown at different temperatures on solid media // *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 1999. Vol. 15. Pp. 131–132.
25. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев, 1988. 144 с.
26. Riazanova T.V., Chuprova N.A., Isaeva E.V. Wood Chemistry. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 428 p.
27. Физиология растений / под ред. И.П. Ермакова. М.: Академия, 2005. 640 с.
28. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: МГУ, 1995. 224 с.
29. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem*. 1976. Vol. 72. Pp. 248–254.

Поступила в редакцию 9 сентября 2020 г.

Принята к публикации 13 ноября 2020 г.

Для цитирования: Литовка Ю.А., Павлов И.Н., Маколова П.В., Тимофеев А.А., Литвинова Е.А., Васильева А.А., Шабанов А.В. Биотехнологический потенциал сибирских штаммов базидиальных грибов – продуцентов ферментов лигноцеллюлозного действия // *Химия растительного сырья*. 2020. №4. С. 371–383. DOI: 10.14258/jcrpm.2020048396.

Litovka Yu.A.^{1,2*}, Pavlov I.N.^{1,2}, Makolova P.V.¹, Timofeev A.A.³, Litvinova E.A.^{2,3}, Vasil'eva A.A.², Shabanov A.V.^{3,4} BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF THE SIBERIAN STRAINS OF BASIDIOMYCETES – PRODUCERS OF LIGNOLYTIC AND CELLULOLYTIC ENZYMES

¹ Institute of Forest named after V.N. Sukachev SB RAS, FRC KSC SB RAS, Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 (Russia), e-mail: litovkajul@rambler.ru

² Siberian State University of Science and Technology named after academician M.F. Reshetneva, pr. Mira, 82, Krasnoyarsk, 660049 (Russia)

³ Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS, Akademgorodok, 50, Krasnoyarsk, 660036 (Russia)

⁴ Institute of Physics L.V. Kirensky SB RAS, Akademgorodok, 50/43, Krasnoyarsk, 660036 (Russia)

The results of a study of the wood-destroying properties of Siberian strains of xylotrophic basidiomycetes (*Armillaria*, *Ganoderma*, *Fomitopsis*, *Heterobasidion* and *Porodaedalea*) are presented. The growth parameters and enzymatic activity of the strains were determined during solid-phase and deep cultivation. *Fomitopsis pinicola* and *Ganoderma lucidum* are fast-growing fungi on cellulose-, tannin-containing nutrient media, coniferous and deciduous plant substrates (source and hydrodynamically activated). The growth coefficient on media with tannin and Na-carboxymethyl cellulose is more than 45; on plant substrates - more than 30. The strains exhibit a different growth reaction to the preliminary activation of birch sawdust (growth acceleration / growth slowdown / indifference). The maximum wood-destroying activity on wood of *A. sibirica* noted for the fungi *A. borealis*, *G. tsugae*, *G. lucidum*, *F. pinicola*, and *P. niemelaii*. The decrease in substrate mass was 8–11%; the amount of polysaccharides decreased on average 1.4 times mainly due to the fermentolysis of hard-hydrolyzable polysaccharides. High enzymatic activity of fungi observed during solid-phase and deep cultivation with an inducer. The maximum activity of phenol oxidase is characteristic of *G. tsugae* (1.21 units/g·s); carboxymethyl cellulase – for *F. pinicola* and *G. lucidum* strains (11.8 and 10.3 units/ml, respectively); xylanases – for *H. abietinum* (3.8 u/ml). The maximum accumulation of extracellular protein observed in *F. pinicola* (0.89 mg/ml). According to the totality of rapid test indicators, quantitative determination of enzymatic activity, growth parameters on lignocellulosic substrates and the degree of wood bioconversion, the most promising producer of lignolytic enzymes in vitro is the Gl4-16A *Ganoderma lucidum* strain; cellulolytic enzymes – strain Fp6-17 *Fomitopsis pinicola*.

Keywords: biodegradation, xylotrophs, basidiomycetes, plant substrates, hydrodynamic activation, solid-phase and deep cultivation, cellulases, ligninases.

References

- Kulikova N.A., Klyayn O.I., Stepanova Ye.V., Korolova O.V. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2011, vol. 47, no. 6, pp. 619–634. (in Russ.).
- Fodorova T.V., Shakhova N.V., Klyayn O.I., Glazunova O.A., Maloshenok L.G., Kulikova N.A., Psurtseva N.V., Korolova O.V. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2013, vol. 49, no. 6, pp. 570–579. (in Russ.).
- Mukhin V.A., Veselkin D.V., Bryndina Ye.V. *Gribnyye soobshchestva lesnykh ekosistem*. [Mushroom communities of forest ecosystems]. Moscow; Petrozavodsk, 2000, pp. 26–36. (in Russ.).
- Baldrian P. *British Mycological Society Symposia Series*, 2008, vol. 28, pp. 19–41.
- Yoon J.J., Kim Y.K. *J. Microbiol.*, 2005, vol. 43 (6), pp. 487–492.
- Yoon J.J., Cha C.J., Kim Y.S., Kim W. *Biotechnol Lett.*, 2008, vol. 30 (8), pp. 1373–1378.
- Litovka YU.A., Pavlov I.N., Ryazanova T.V., Gazizulina A.V., Chuprova N.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 1, pp. 193–199. DOI: 10.14258/jcprm.2018012729.
- Shin K., Kim Y.H., Jeya M., Lee J.K., Kim Y.S. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2010, vol. 20 (12), pp. 1681–1688.
- Machuca A., Ferraz A. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, vol. 29 (6), pp. 386–391.
- Valášková V., Baldrian P. *Microbiology*, 2006, vol. 152 (12), pp. 3613–3622.
- Hastrup A.C., Howell C., Larsen F.H., Sathitsuksanoh N., Goodell B., Jellison J. *Fungal Biol.*, 2012, vol. 116 (10), pp. 1052–1063.
- Kim Y.S., Wi S.G., Lee K.H., Singh A.P. *Holzforschung*, 2002, vol. 56 (1), pp. 7–12.
- Quiroz-Castaeda R.E., Balcazar-Lopez E., Dantan-Gonzalez E., Martinez A., Folch-Mallol J., Anaya C.M. *Electron J Biotechnol.*, 2009, vol. 12, pp. 1–8.
- Salvachúa D., Prieto A., López-Abelairas M., Lu-Chau T., Martínez Á. T., Martínez M.J. *Bioresource technology*, 2011, vol. 102 (16), pp. 7500–7506.
- Saha B.C., Kennedy G.J., Qureshi N., Cotta M.A. *Biotechnology Progress*, 2017, vol. 33(2), pp. 365–374.
- Govumoni S.P., Gentela J., Koti S., Haragopal V., Venkateshwar S., Rao L.V. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2015, vol. 4(10), pp. 700–710.
- Montoya S., Sanchez O.J., Levin L. *African Journal of Biotechnology*, 2015, vol. 14 (15), pp. 1304–1317.
- Elisashvili V., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Khardziani T., Agathos S.N. *World J Microbiol Biotechnol.*, 2009, vol. 25(2), pp. 331–339.
- Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Kharziani T., Kvesitadze G. *Bioresource Technology*, 2008, vol. 99, no. 3, pp. 457–462.
- Jaana K., Miia M.R., Jarkko I., Ilona O., Taina L. *BMC Microbiology*, 2015, vol. 15(217), pp. 1–18.
- Pavlov I.N., Litovka Yu.A., Ryazanova T.V., Chuprova N.A., Litvinova E. A., Putintseva Y.A., Kues U., Krutovsky K.V. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2018, vol. 11, no. 1, pp. 30–48. DOI: 10.17516/1997-1389-0039.
- Metody eksperimental'noy mikologii* [Methods of experimental mycology], ed. V.I. Bilay. Kiev, 1982, 550 p. (in Russ.).

* Corresponding author.

23. Alves E., Lucas G.C., Pozza E.A., Alves M.de C. *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology*, Springer Science + Business Media, LLC, 2013, pp. 133–150.
24. Bradner J.R., Gillings M., Nevalainen K.M.H. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1999, vol. 15, pp. 131–132.
25. Bukhalo A.S. *Vysshiyе s"yedobnyye bazidiomitsety v chistoy kul'ture*. [Higher edible Basidiomycetes in pure culture]. Kiev, 1988, 144 p. (in Russ.).
26. Riazanova T.V., Chuprova N.A., Isaeva E.V. *Wood Chemistry*, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012, 428 p.
27. *Fiziologiya rasteniy* [Plant Physiology], ed. I.P. Yermakov. Moscow, 2005, 640 p. (in Russ.).
28. Sinitsyn A.P., Gusakov A.V., Chernoglazov V.M. *Biokonversiya lignotsellyuloznykh materialov*. [Bioconversion of lignocellulosic materials]. Moscow, 1995, 224 p. (in Russ.).
29. Bradford M.M. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254.

Received September 9, 2020

Accepted November 13, 2020

For citing: Litovka Yu.A., Pavlov I.N., Makolova P.V., Timofeev A.A., Litvinova E.A., Vasil'eva A.A., Shabanov A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 4, pp. 371–383. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020048396.

