

УДК 579.66

## ПЕРСПЕКТИВЫ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *FOMITOPSIS PINICOLA* (SW.) P. KARST. НА ГИДРОДИНАМИЧЕСКИ АКТИВИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОТХОДАХ

© И.Н. Павлов<sup>1,2</sup>, Ю.А. Литовка<sup>1,2\*</sup>, Е.А. Литвинова<sup>2,3</sup>, С.М. Петренко<sup>3</sup>, Р.Х. Эназаров<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup> Красноярский научный центр СО РАН, Академгородок, 50, Красноярск, 660036 (Россия)

Представлены результаты твердофазного и глубинного культивирования сибирского штамма Fr6-17 *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. Определены ростовые параметры на целлюлозосодержащих агаризованных средах и растительных субстратах с добавлением твердой фазы после гидродинамической активации хвои пихты и опилок березы. Радиальная скорость роста составила 3.0–4.3 мм/сут; ростовой коэффициент – 37–64. Отмечены существенные изменения состава полисахаридов в активированных опилках березы в ходе ферментации, несмотря на невысокие показатели ростового коэффициента гриба. После гидродинамической активации содержание легкогидролизуемых полисахаридов (ЛГП) увеличилось на 9%, доля трудногидролизуемых полисахаридов (ТГП) уменьшилась на 8%; после дальнейшего твердофазного культивирования содержание ЛГП и ТГП снизилось соответственно на 10 и 23%. Подобраны условия глубинного культивирования штамма на модифицированной среде Норкранс для высокого выхода фермента карбоксиметилцеллюлазы: при 26 °С и рН 4.6 на седьмые сутки максимальная активность составила 13.6 ед/мл; выход биомассы – 16.2 г/л. Подобран оптимальный состав среды на основе твердой фазы после гидродинамической обработки хвои пихты и опилок березы с обогащением (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: максимальная активность фермента составила 14.2 ед/мл. При высокой ферментативной активности отмечено формирование мелких глобул диаметром до 5 мм и меньший прирост биомассы. При более низкой активности фермента в большинстве случаев зафиксирован больший прирост биомассы за счет образования крупных эллипсоидных пеллет с бахромчатым краем.

**Ключевые слова:** базидиальные ксилотрофы, *Fomitopsis pinicola*, растительные отходы, гидродинамическая активация, твердофазное и глубинное культивирование, целлюлолитические ферменты, карбоксиметилцеллюлаза.

### Введение

Биодеградация органического вещества древесины – это природный процесс, обеспечивающий круговорот углерода и экологическое равновесие в лесных экосистемах. Одними из наиболее активных биодеструкторов лигноцеллюлозного комплекса являются базидиальные грибы, приспособленные к существованию в порах плотного субстрата с высоким содержанием трудногидролизуемых полисахаридов и лигнина.

---

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

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

Окончание на С. 386.

В то время как грибы белой гнили (white-rot fungi) способны ферментировать все биополимеры лигноцеллюлозы, возбудители деструктивных бурых гнилей (brown-rot fungi) разрушают преимущественно полисахариды с незначительной модификацией лигнина. Мицелий проникает в древесину из сердцевинных лучей отдельными разветвленными гифами и заполняет полость клетки густым

---

\* Автор, с которым следует вести переписку.

переплетением гиф, иногда формируя клубки. Характер и интенсивность гниения, снижение плотности и прочности древесины зависит от состава ферментных систем ксилотрофных грибов и активности отдельных ферментов [1, 2].

Типичный представитель грибов бурой гнили – это *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. (трутовик окаймленный), который является космополитом в лесах бореальной зоны и биодеструктурирует древесину различных хвойных пород, но особенно интенсивно – *Pinus* и *Abies*. Как правило, окаймленный трутовик начинает жизненный цикл на ослабленных живых деревьях, после чего переходит в сапротрофную стадию на пнях, сухостое и валежной древесине в различной стадии разложения. *F. pinicola* является эффективным ранним колонизатором огромного запаса ресурсов мертвой древесины, например, вызванного вспышкой короедов; его базидиомы могут сохраняться в течение 21 года [2–4]. Высокая дереворазрушающая активность гриба обусловлена наличием целлюлолитических ферментов, осуществляющих глубокий гидролиз трудногидролизуемых полисахаридов. Кроме того, *F. pinicola* выгодно отличается от многих базидиальных грибов высокой скоростью роста, даже в условиях *in vitro*, что открывает возможности его активного применения в промышленной биотехнологии как продуцента ферментных препаратов [5–9].

Максимальный выход ферментов и эффективность осахаривания лигноцеллюлозной биомассы во многом определяется условиями культивирования и оптимизацией состава питательной среды. Так, штамм МКАСС 54347 *F. pinicola* продуцировал высокое количество эндоглюканазы на минеральной среде Манделя (минеральный состав; 1% целлюлозы; 0.1% пептона; 0.14 и 0.03% мочевины, 0.2, 0.03, 0.03 и 0.1% раствора микроэлементов) в течение 8 суток при pH 5.0. После оптимизации максимум активности был достигнут на среде, содержащей 2% карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), 2% дрожжевого экстракта и 0.03–0.3% раствора металлов [10]. Активность  $\beta$ -глюкозидазы штамма КСТС 6208 *F. pinicola* напрямую зависела от концентрации и соотношения компонентов питательной среды. Максимальный показатель составил 15.34 ед/мг (после оптимизации среды и добавлении 3.02% глюкозы, 4.35% дрожжевого экстракта и 7.41% аскорбиновой кислоты), что в 23.6 раза выше, чем предварительное значение активности (0.63 ед/мг) [11]. Изменение и стабилизация ферментативной активности могут быть достигнуты при иммобилизации ферментов целлюлазного комплекса. Исследование штамма КМЖ812 *F. pinicola* с высокой глюкозидазной активностью показало, что при иммобилизации ферментов на смоле Duolite A568 их активность была выше, чем у не иммобилизованных растворимых целлюлаз. После 72-часовой инкубации при pH 4.0 активность целлюлазы сохранялась на 98% от первоначального показателя; после восьмикратного использования – на 50% [12].

В настоящее время ферментолит не считается единственным механизмом деструкции древесины под влиянием *F. pinicola*. Проводятся исследования по наличию не ферментативной активности, связанной с реакцией Фентона (восстановление  $Fe^{3+}$  и образование метаболитов) при глубинном культивировании грибов с добавлением древесины. Биохимические исследования профиля метаболитов финских изолятов *F. pinicola* выявили наличие широкого спектра ферментов, включая эндоглюканазу, ксиланазу,  $\beta$ -глюкозидазу, хитиназу, кислую пептидазу, наряду с генерацией низкого значения pH, накоплением щавелевой кислоты и метаболитов, снижающих содержание  $Fe^{3+}$ , что расширяет возможные механизмы биоконверсии древесины грибами бурой гнили [2, 13].

Исследование уровней экспрессии генов *F. pinicola* из глубинных культур с измельченным древесным порошком (через 5 суток культивирования) и твердофазных культур на древесине осины, сосны и ели (через 10 и 30 суток) выявило, что штамм экспрессировал сходные наборы дереворазрушающих ферментов, типичных для грибов бурой гнили при всех способах культивирования в разные моменты времени. Однако гены, проявляющие дифференциальную экспрессию и редактирование РНК, кодируют разнообразные ферменты

---

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

Петренко Стефания Михайловна – младший научный сотрудник лаб. геномных исследований и биотехнологии, e-mail: stefaniya\_vuytovich@mail.ru

Эназаров Рустам Хамиджанович – младший научный сотрудник лаборатории геномных исследований и биотехнологии, e-mail: rusya955@mail.ru

с известной или потенциальной дереворазрушающей функцией, включая лакказу, бензохинонредуктазу, оксидазу арилспирта, цитохром P450 и различные гликозидгидролазы. Не было совпадений между дифференциально экспрессируемыми и дифференциально отредактированными генами, что позволяет предположить, что они предоставляют штаммам *F. pinicola* независимые механизмы реагирования на окружающие условия. Сравнение

транскриптомов из глубинных культур и древесины выявило, что условия культивирования оказали большее влияние на глобальные профили экспрессии по сравнению с субстратными породами древесины [14].

Окаймленный трутовик является типичным возбудителем бурой гнили древесины, однако в отдельных исследованиях упоминается о наличии у данного гриба ферментов лигнин-разрушающего комплекса. Например, в культуральном фильтрате *F. pinicola* обнаружена новая лакказа, которая проявляет максимум активности при 25 °С на 8-е сутки культивирования. Молекулярная масса фермента 92 кДа; оптимум pH 3.0 (диапазон 1.5–11), температуры – 80 °С. Фермент показал наибольшую удельную активность при использовании 2,2-азино-бис (3-этилтиазолин-6-сульфоната) в качестве субстрата [15]. Увеличение активности лакказы было достигнуто при оптимизации питательной среды: максимальная продуктивность отмечена добавлении 2% глюкозы, 0.4% пептона, 0.05%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и 0.05%  $\text{CaCl}_2$  [16].

С учетом высокой ферментативной активности *F. pinicola* высказывается мнение о перспективности использования этих грибов для деградации различных ксенобиотиков. Выявлена их способность обесцвечивать и преобразовывать метиловый оранжевый в концентрации 50 мг/л с индексом обесцвечивания до 91% предположительно в реакциях деметилирования, десульфонилирования и гидроксирования [17]. Штаммы *F. pinicola* способны деградировать поливиниловый спирт в кварцевом песке по реакции Фентона, что можно использовать для разложения ПВА в древесных отходах [18]. Рассматривается возможность использования растительных отходов, колонизированных биомассой *F. pinicola* в качестве недорогих альтернативных адсорбентов для очистки сточных вод, содержащих Cr (VI) с низкой концентрацией [19]. Выявлена способность штаммов *F. pinicola* деградировать ДДТ на 42% в течение 7-суточного периода инкубации в монокультуре и до 76% – совместно с бактериальными культурами [20, 21].

Исходя из перспективности применения окаймленного трутовика для биоконверсии растительных отходов, целью данной работы было исследование ферментативной активности сибирского штамма Fr6-17 *Fomitopsis pinicola* и возможности его глубинного культивирования на среде с добавлением мелкодисперсной твердой фазы, полученной при гидродинамической активации растительного сырья.

### **Экспериментальная часть**

Объектом исследования служил сибирский штамм Fr6-17 *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst., изолированный в чистую культуру из соответствующей базидиомы (рис. 1А), произраставших на живой древесине *Pinus sylvestris* L., методом накопления во влажной камере с последующим пересевом на агаризованные среды [22]. Культуральные особенности штамма на натуральных средах (морковный агар, мальт-экстракт агар), синтетических средах (среда Гетчинсона с 0.5% микрокристаллической целлюлозы (МКЦ), Чапека-Докс с 1% натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ)), растительных субстратах (исходных и гидродинамически активированных) представлены на рисунке 1 В-Д. Микроструктуры, изученные методами светопольной микроскопии (Nikon Eclipse Ci, Япония) в микрокамерах [22] и сканирующей электронной микроскопии (Hitachi SU3500, Япония) [23], представлены на рисунке 1Б. Видовую идентификацию подтверждали секвенированием участков генетических маркеров ITS и TEF-1alpha с использованием оборудования ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

Твердофазное культивирование осуществляли на различных композициях растительных субстратов, включающих хвою пихты и опилки березы после гидродинамической обработки с добавлением исходных щепы и опилок осины. Влажность субстратов 70%; температура  $25 \pm 1$  °С; длительность 10 сут. На всех субстратах определяли ростовые параметры (радиальная скорость роста и ростовой коэффициент) [24]; на гидродинамически активированных опилках березы исследовали химический состав до и после биодеструкции [25]. Активность фермента карбоксиметилцеллюлаза (КМЦ-аза) определяли при глубинном культивировании методом Нельсона-Шомоди: спектрофотометрически (610 нм) по скорости образования восстанавливающих сахаров при ферментативном гидролизе натриевой соли КМЦ, образующихся за 1 мин при 50 °С и pH 5.0 [26]. Содержание белка в культуральной жидкости оценивали по методу Бредфорд [27].

Глубинное культивирование осуществляли в термостатируемом шейкер-инкубаторе (BIORUS DS 2012, Китай) в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на двух типах питательных средах: 1. Модифицированная среда Норкранс (г/л): глюкоза – 1,  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  – 1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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,  $\text{MnSO}_4$  – 5 мг,  $\text{CaCl}_2$  – 55.5 мг, витамин

$V_1$  – 40 мг. Режим культивирования: 200 об. · мин<sup>-1</sup>; 21–27 °С; pH 3.8–5.4; 10 сут. 2. Среда с добавлением мелкодисперсной твердой фазы после гидродинамической обработки: хвоя пихты (5–10 г) и/или опилки березы (10–20 г), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.15–0.30 г) (всего 27 вариантов). Режим культивирования: 200 об. · мин<sup>-1</sup>; 26 °С; pH 4.0–6.0; 10 сут. Механоактивацию растительного сырья проводили на кавитационном гидроударном диспергаторе (радиус ротора 277 мм, частота вращения 3000 об./мин, длительность в водной среде 30 мин, гидромодуль 10). В качестве инокулюма использовали агаровые блоки диаметром 13 мм с предварительно выращенной семисуточной культурой гриба.

### Обсуждение результатов

При исследовании ростовых параметров штамма Fr6-17 *F. pinicola* максимальные показатели выявлены на агаризованных питательных средах с натуральными компонентами – мальт-экстракт агар и морковный агар: радиальная скорость роста (СР) составила соответственно 5.5 и 5.8 мм/сут; ростовой коэффициент (РК) – 115 и 120, что характеризует штамм как быстрорастущий (табл.). На средах с добавлением микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) ростовые параметры были существенно ниже, но при этом достаточно высокими для базидиальных грибов, которые в большинстве случаев являются медленно растущими. Радиальная скорость роста составила соответственно 3.0 и 3.7 мм/сут; ростовой коэффициент 50 и 59.

При твердофазном культивировании гриба на гидродинамически активированных растительных субстратах ростовые параметры в отдельных случаях были сопоставимыми с данными, полученными на агаризованных средах с целлюлозой, и зависели от соотношения компонентов в субстратной формуле. Радиальная скорость роста варьировала от 3.6 до 4.3 мм/сут; ростовой коэффициент – от 38 до 64. Максимальные показатели отмечены при использовании в качестве основы активированной хвои пихты с добавлением исходных щепы и опилок осины в соотношении 2 : 2 : 1. На активированных опилках березы радиальная скорость роста гриба была относительно высокой (3.6–3.9 мм/сут), однако значения ростового коэффициента невелики (37–43), что характеризует штамм как медленно растущий и свидетельствует о его недостаточной адаптированности к субстрату.



Рис. 1. Морфологические и культуральные особенности штамма Fr6-17 *Fomitopsis pinicola*. А – базидиома *in situ*; Б – микроструктуры (мицелий с пряжками; увеличение × 2000–9000); В – морфология колонии на агаризованных средах (Норкранс-агар, морковный агар); Г – морфология на исходном растительном субстрате (опилки пихты и осины); Д – морфология колонии на гидродинамически активированном субстрате (хвоя пихты, опилки березы)

Ростовые параметры штамма Fr6-17 *Fomitopsis pinicola* на агаризованных питательных средах и растительных субстратах

Ростовой параметр	Агаризованные питательные среды			
	мальт-экстракт агар	морковный агар	среда Гетчинсона с 0.5% МКЦ	среда Чапека-Докс с 1% Na-КМЦ
Радиальная скорость роста, мм/сут	5.6 ± 0.83	5.8 ± 0.61	3.0 ± 0.12	3.7 ± 0.19
Ростовой коэффициент	115	120	50	59
	гидродинамически активированные растительные субстраты с добавлением исходного сырья			
	хвоя <i>Abies sibirica</i>		опилки <i>Betula L.</i>	
	хвоя пихты*: щепа осины: опилки осины = 3 : 1 : 1	хвоя пихты*: щепа осины: опилки осины = 2 : 2 : 1	опилки березы*: щепа осины: опилки осины = 3 : 1 : 1	опилки березы*: щепа осины: опилки осины = 2 : 2 : 1
Радиальная скорость роста, мм/сут	3.8 ± 0.12	4.3 ± 0.16	3.6 ± 0.22	3.9 ± 0.12
Ростовой коэффициент	56	64	37	43

Примечание: \* – гидродинамически активированный растительный компонент.

Установлено изменение полисахаридного состава растительного сырья (на примере опилок березы) после гидродинамической обработки и последующего твердофазного культивирования штамма Fr6-17. После активации растительного субстрата отмечено увеличение концентрации легкогидролизуемых полисахаридов (ЛГП) в среднем на 9% (вероятно, за счет разрушения аморфной части целлюлозного волокна) и снижение доли трудногидролизуемой полисахаридной фракции (ТГП) на 8% от исходного значения. Культивирование гриба на гидродинамическом активированном сырье способствовало дальнейшей конверсии березовых опилок: содержание ЛГП и ТГП снизилось соответственно на 10 и 23% по сравнению с активированным субстратом до биодеструкции. Таким образом, относительно высокие ростовые параметры штамма Fr6-17 *F. pinicola* при твердофазной ферментации и глубокие биохимические изменения субстрата в ходе биоконверсии свидетельствуют о возможности применения предварительной гидродинамической активации для подготовки ростового субстрата и культивирования на нем трутовика окаймленного. Для исследования перспективности получения ферментов целлюлолитического действия на таких субстратах было проведено глубинное культивирование штамма на питательных средах с различной комбинацией компонентов.

На первом этапе осуществили культивирование на модифицированной среде Норкранс (с МКЦ) в температурном диапазоне 21–27 °С в течение 10 суток. Установлено, что в глубинной культуре наиболее благоприятный температурный режим для высокого выхода карбоксиметилцеллюлазы составляет 25–27 °С (рис. 2). Максимальные показатели ферментативной активности и биомассы отмечены на 7-е сутки культивирования. Активность КМЦ-зы находилась в пределах 11.1–12.4 ед / мл и сохранялась на высоком уровне до 10 суток культивирования; продуктивность по биомассе составила 14.3–15.1 г/л.

Для определения оптимальной кислотности провели культивирование штамма Fr6-17 на среде аналогичного состава при температуре 26 °С с интервалом значений pH от 3.8 до 5.5. Показано, что ферментные системы гриба чувствительно реагируют на изменение pH. При кислотности среды в диапазоне 4.2–5.0 зафиксированы наибольшие показатели активности КМЦ-азы, начиная с пятых суток глубинного культивирования (11.4–13.5 ед/мл), и прироста биомассы – 14.7–16.2 г/л (рис. 3). При значении pH 3.8 и 5.4 отмечено существенное снижение ферментативной активности (максимальные показатели 7.4–7.9 ед/мл), а также уменьшение продуктивности до 9.2–9.4 г/л. В целом, максимальные показатели активность КМЦ-азы (13.6 ед/мл) и накопления биомассы (16.2 г/л) штаммом Fr6-17 выявлены на модифицированной среде Норкранс с целлюлозой и глюкозой при 26 °С и pH 4.6 на седьмые сутки культивирования.

На втором этапе осуществляли глубинное культивирование штамма в течение 7 суток при 26 °С на питательной среде, приготовленной на основе мелкодисперсной твердой фазы после гидродинамической обработки хвои пихты (5–10 г) и/или опилок березы (10–20 г) с обогащением источником азота (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – всего 27 вариантов. Максимальные показатели отмечены в варианте питательной среды №9, содержащей 3.3% пихтовой хвои, 6.7% березовых опилок и 0.13% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Активность КМЦ-зы составила 13.7 ед/мл; содержание белка в культуральной жидкости – 0.6 мг/мл. Продуктивность по биомассе была достаточно высокой – 12.9 г/л, при этом отмечено формирование преимущественно мелких сферических пеллет диаметром до 5 мм и отсутствие крупных, хорошо визуализируемых эллипсоидных образований (рис. 4А).



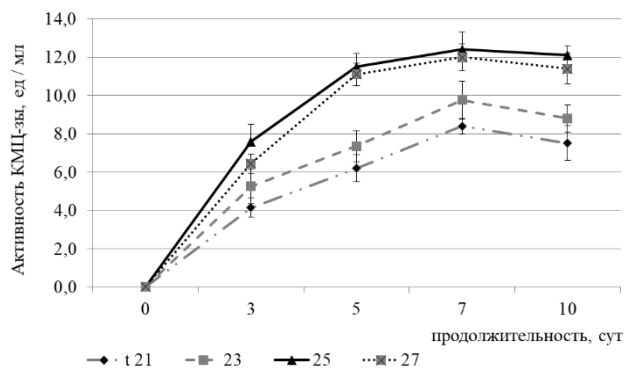


Рис. 2. Активность карбоксиметилцеллюлазы глубинной культуры *Fomitopsis pinicola* на модифицированной среде Норкранс при различной температуре

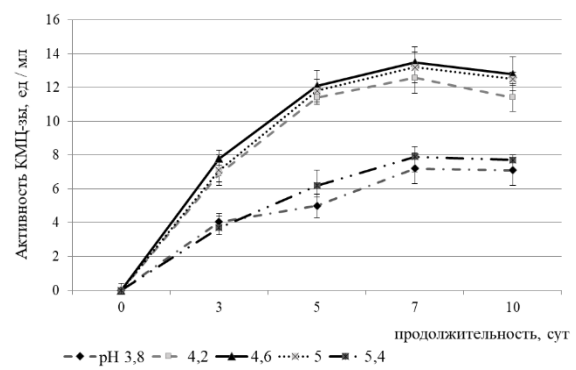


Рис. 3. Активность карбоксиметилцеллюлазы глубинной культуры *Fomitopsis pinicola* на модифицированной среде Норкранс при различной кислотности среды

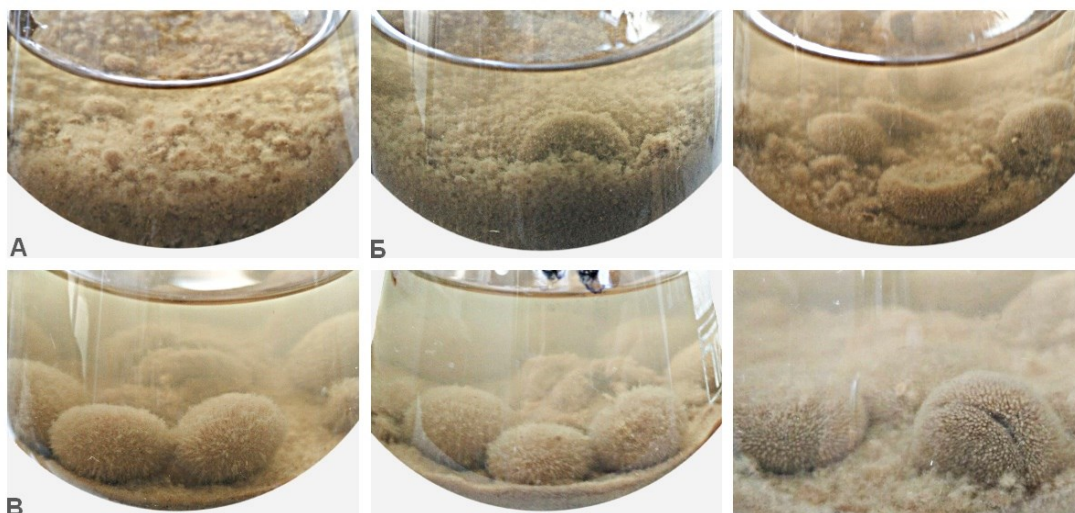


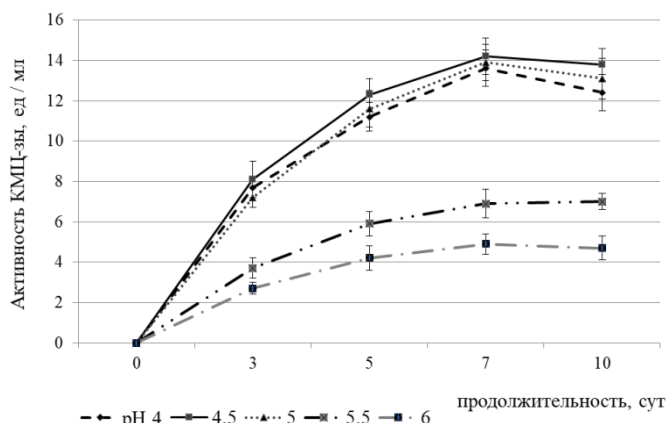
Рис. 4. Формирование глубинных мицелиальных пеллет штаммом Fp6-17 *Fomitopsis pinicola* в глубинной шейкерной культуре на средах с различным соотношением гидродинамически активированного растительного сырья

В остальных случаях при варьировании соотношения и количества компонентов среды отмечены более низкие показатели ферментативной активности (от 4.2 до 11.2 ед/мл), тогда как содержание внеклеточного белка и прирост биомассы в отдельных случаях были выше – пределы варьирования составили соответственно 0.2–0.8 мкг/мл и 9.7–16.7 г/л. В большинстве вариантов отмечено образование смешанных мицелиальных пеллет – мелких и крупных (рис. 4Б); в случае большого прироста биомассы формировались, как правило, очень крупные эллипсоидные пеллеты с бахромчатым краем (рис. 4В).

На рисунке 5 представлена динамика изменения активности КМЦ-азы на среде №9 (на основе гидродинамического активированного растительного сырья) в диапазоне рН от 4 до 6.0 при температуре 26 °С. Оптимум рН составил 4.5 (максимальная активность фермента 14.2 ед / мл); в диапазоне рН от 4 до 5 активность КМЦ-азы оставалась высокой – 13.6–13.9. Отклонение от оптимального значения привели к снижению ферментативной активности в 2–3 раза.

Таким образом, при поддержании оптимальной температуры и рН сопоставимые значения ферментативной активности были получены на синтетической модифицированной среде Норкранс с микрокристаллической целлюлозой и варианте питательной среды на основе гидродинамически активированных растительных отходов, обогащенных дополнительным источником азотного питания. Полученные данные свидетельствуют о возможности приготовления питательных сред на основе кавитированного растительного сырья для глубинного культивирования базидиального гриба *F. pinicola* с высоким выходом фермента карбоксиметилцеллюлазы.

Рис. 5. Активность карбоксиметилцеллюлазы штамма Fr6-17 *Fomitopsis pinicola* при различной кислотности среды на среде с мелкодисперсной твердой фазой после гидродинамической обработки



### Заключение

Ксилотрофный штамм Fr6-17 *Fomitopsis pinicola* характеризуется высокими ростовыми параметрами на натуральных агаризованных средах (CP=5.5–5.8 мм/сут; РК=115–120) и средними показателями на синтетических средах с микрокристаллической целлюлозой и карбоксиметилцеллюлозой (CP=3.0–3.7 мм/сут; РК=50–59), что выгодно отличает его от большинства культивируемых медленно растущих ксилотрофных базидиомицетов.

Штамм эффективно колонизирует гидродинамически активированные растительные отходы; ростовые параметры зависят от соотношения компонентов в субстратной формуле. Максимальные показатели отмечены при использовании активированной хвои *Abies sibirica* с добавлением исходных щепы и опилок осины в соотношении 2 : 2 : 1 (CP=4.3 мм/сут; РК=64). Полисахаридный состав березовых опилок претерпевает изменения после гидродинамической обработки и последующего твердофазного культивирования, несмотря на невысокие показатели ростового коэффициента гриба на этом субстрате. После активации опилок отмечено увеличение содержания ЛПП на 9% и снижение доли ТПП на 8%; после твердофазного культивирования – снижение содержания ЛПП и ТПП соответственно на 10 и 23%.

Подобраны условия глубинного культивирования штамма Fr6-17 *F.pinicola* на модифицированной среде Норкранс с микрокристаллической целлюлозой. Максимальные показатели активности карбоксиметилцеллюлазы (13.6 ед/мл) и биомассы (16.2 г/л) отмечены на 7-е сутки при 26 °C и pH 4.6. Проведено глубинное культивирование штамма в оптимальных условиях на средах, содержащих мелкодисперсную твердую фазу после гидродинамической обработки хвои пихты и/или опилок березы в различных соотношениях. Максимальная активность фермента (14.2 ед/мл), сопоставимая с показателями на модифицированной среде Норкранс, зафиксирована в следующем варианте питательной среды: 3.3% пихтовой хвои; 6.7% березовых опилок; 0.13% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Отмечено формирование глобул диаметром до 5 мм; продуктивность по биомассе составила 12.9 г/л. В случае большого прироста биомассы и меньшей ферментативной активности, как правило, происходило образование крупных эллипсоидных пеллет.

### Список литературы

1. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композиций: Кн. I. Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. 264 с.
2. Shah F., Mali T., Lundell T. Polyporales brown rot species *Fomitopsis pinicola*: enzyme activity profiles, oxalic acid production, and Fe<sup>3+</sup>-reducing metabolite secretion // Applied and Environmental Microbiology. 2018. Vol. 84(8). e02662-17. DOI: 10.1128/AEM.02662-17
3. Шевкопляс В.Н., Вовк Н.В., Мезенцева Т.В., Бойко М.И. Физиологические особенности базидиомицетов – разрушителей хвойной древесины // Промышленная ботаника. 2004. Вып. 4. С. 256–262.
4. Vogel S., Alvarez B., Bässler C. et al. The red-belted bracket (*Fomitopsis pinicola*) colonizes spruce trees early after bark beetle attack and persists // Fungal Ecology. 2017. Vol. 27. Pp. 182–188. DOI: 10.1016/j.funeco.2016.12.007.
5. Shin K., Kim Y., Marimuthu J., Lee J.-K., Kim Y.-S. Purification and characterization of a thermostable cellobiohydrolase from *Fomitopsis pinicola* // J. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 20 (12). Pp. 1681–1688. DOI: 10.4014/jmb.1008.08009.

6. Shin K., Marimuthu J., Lee J.-K., Kim Y.-S. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Fomitopsis pinicola* // J. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 20 (10). Pp. 1415–1423. DOI: 10.4014/jmb.1003.03031.
7. Joo A.R., Jeya M., Lee K.M., Sim W.I., Kim J.S., Kim I.W., Kim Y.S., Oh D.K., Gunasekaran P., Lee J.K. Purification and characterization of a beta-1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 83(2). Pp. 285–294. DOI: 10.1007/s00253-009-1861-7.
8. Литовка Ю.А., Павлов И.Н., Рязанова Т.В., Газизулина А.В., Чупрова Н.А. Девевооразрушающие свойства сибирских штаммов *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. // Химия растительного сырья. 2018. №1. С. 193–199. DOI: 10.14258/jcrpm.2018012729.
9. Yoon J.-J., Cha Ch.-J., Kim Y.-S., Kim W. Degradation of cellulose by the major endoglucanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola* // Biotechnology Letters. 2008. Vol. 30(8). Pp. 1373–1378. DOI: 10.1007/s10529-008-9715-4.
10. Gu J.-M., Park S.-S. Optimization of endoglucanase production from *Fomitopsis pinicola* mycelia // Korean Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013. Vol. 41(2). DOI: 10.4014/kjmb.1301.01007.
11. Park A.R., Park J.-H., Ahn H.-J. et al. Enhancement of  $\beta$ -glucosidase activity from a brown rot fungus *Fomitopsis pinicola* KCTC 6208 by medium optimization // Mycobiology. 2015. Vol. 43(1). Pp. 57–62. DOI: 10.5941/MYCO.2015.43.1.57.
12. Shin K., Kim T.-J., Kim Y.-K., Kim Y.-S. Immobilization of cellulases from *Fomitopsis pinicola* and their changes of enzymatic characteristics // Journal of the Korean Wood Science and Technology. 2010. Vol. 38 (3). Pp. 251–261. DOI: 10.5658/WOOD.2010.38.3.251.
13. Mali T., Mäki M., Hellén H. et al. Decomposition of spruce wood and release of volatile organic compounds depend on decay type, fungal interactions and enzyme production patterns // FEMS Microbiology Ecology. 2019. Vol. 95(9). DOI: 10.1093/femsec/fiz135.
14. Wu B., Gaskell J., Held B.W. et al. Substrate-specific differential gene expression and RNA editing in the brown rot fungus *Fomitopsis pinicola* // Applied and Environmental Microbiology. 2018. Vol. 84(16). e00991-18. DOI: 10.1128/AEM.00991-18.
15. Park N., Park S.-S. Purification and characterization of a novel laccase from *Fomitopsis pinicola* mycelia // International journal of biological macromolecules. 2014. Vol. 70. Pp. 583–589. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.019.
16. Park N., Park S.-S. Optimal conditions for the laccase production from *Fomitopsis pinicola* mycelia // Korean Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009. Vol. 37(1). Pp. 62–68.
17. Purnomo A.S., Mauliddawati V.T., Khoirudin M. et al. Bio-decolorization and novel biotransformation of methyl orange by brown-rot fungi // International journal of Environmental Science and Technology. 2019. Vol. 16. Pp. 7555–7564. DOI: 10.1007/s13762-019-02484-3.
18. Tsujiyama S., Okada A. Biodegradation of polyvinyl alcohol by a brown-rot fungus, *Fomitopsis pinicola* // Biotechnology Letters. 2013. Vol. 35(11). Pp. 1907–1911. DOI: 10.1007/s10529-013-1281-8.
19. Pertile E., Zamarsky P. An alternative method of removing Cr (VI) from aquatic solution using chemically modified cone biomass and *Fomitopsis pinicola* // IOP Conference Series Earth and Environmental Science. 2020. Vol. 444. 012043. DOI: 10.1088/1755-1315/444/1/012043.
20. Sariwati A., Purnomo A. S., Kamei I. Abilities of co-cultures of brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola* and *Bacillus subtilis* on biodegradation of DDT // Current Microbiology. 2017. Vol. 74(4). Pp. 1068–1075. DOI: 10.1007/s00284-017-1286-y.
21. Sariwati A., Purnomo A.S. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* addition on 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) biodegradation by brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola* // Indonesian Journal of Chemistry. 2018. Vol. 18(1). P. 75. DOI: 10.22146/ijc.25158.
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. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев, 1988. 144 с.
25. Riazanova T.V., Chuprova N.A., Isaeva E.V. Wood Chemistry. LAP LAMBERT Academic Publishing. 2012. 428 p.
26. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М., 1995. 224 с.
27. 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:** Павлов И.Н., Литовка Ю.А., Литвинова Е.А., Петренко С.М., Эназаров Р.Х. Перспективы глубинного культивирования *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. на гидродинамически активированных растительных отходах // Химия растительного сырья. 2020. №4. С. 385–394. DOI: 10.14258/jcrpm.2020048400.



Pavlov I.N.<sup>1,2</sup>, Litovka Yu.A.<sup>1,2\*</sup>, Litvinova E.A.<sup>2,3</sup>, Petrenko S.M.<sup>3</sup>, Enazarov R.Kh.<sup>1</sup> PROSPECTS FOR DEEP CULTIVATION OF *FOMITOPSIS PINICOLA* (SW.) P. KARST. ON HYDRODYNAMIC ACTIVATED PLANT WASTE

<sup>1</sup> 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

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

<sup>3</sup> Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS, Akademgorodok, 50, Krasnoyarsk, 660036 (Russia)

The results of solid-phase and deep cultivation of the Siberian strain Fp6-17 *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. are presented. Growth parameters were determined on cellulose-containing agarized media and plant substrates with the addition of a solid phase after hydrodynamic activation of fir needles and sawdust of birch. Radial growth rate 3.0–4.3 mm / day; growth coefficient 37–64. Changes in polysaccharides in activated birch sawdust during fermentation noted, despite the low growth coefficient of the fungus. After hydrodynamic activation, the content of easily hydrolysable polysaccharides increased by 9 %, the proportion of hardly hydrolysable polysaccharides decreased by 8%. After further solid-phase cultivation, the content of easily and hardly hydrolysable polysaccharides decreased by 10 and 23%, respectively. The conditions for the deep cultivation of the strain Fp6-17 on a modified Norkrans medium with microcrystalline cellulose selected. At 26 °C and a pH of 4.6 on the seventh day, the maximum activity of carboxymethyl cellulase was 13.6 units / ml; biomass yield – 16.2 g/l. The optimal composition of the solid phase medium was selected after hydrodynamic processing of fir needles and sawdust of birch with enrichment of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The maximum activity of the enzyme was 14.2 u/ml. With high enzymatic activity in the culture fluid, the formation of small globules with a diameter of up to 5 mm and a smaller amount of biomass is noted. At lower enzyme indices, in most cases a greater increase in biomass recorded due to the formation of large ellipsoid pellets with a fringed edge.

**Keywords:** basidiomycetes, xylotrophs, *Fomitopsis pinicola*, plant waste, hydrodynamic activation, solid-phase and deep cultivation, cellulolytic enzymes, carboxymethyl cellulase.

### References

1. Rabinovich M.L., Bolobova A.V., Kondrashchenko V.I. *Teoreticheskiye osnovy biotekhnologii drevesnykh kompozitov: Kn. I. Drevesina i razrushayushchiye yeye griby*. [Theoretical foundations of biotechnology of wood composites: Book. I. Wood and fungi that destroy it]. Moscow, 2001, 264 p. (in Russ.).
2. Shah F., Mali T., Lundell T. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, vol. 84(8), e02662-17. DOI: 10.1128/AEM.02662-17.
3. Shevkopyas V.N., Vovk N.V., Mezentseva T.V., Boyko M.I. *Promyshlennaya botanika*, 2004, vol. 4, pp. 256–262.
4. Vogel S., Alvarez B., Bässler C. et al. *Fungal Ecology*, 2017, vol. 27, pp. 182–188. DOI: 10.1016/j.funeco.2016.12.007.
5. Shin K., Kim Y., Marimuthu J., Lee J.-K., Kim Y.-S. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, vol. 20 (12), pp. 1681–1688. DOI: 10.4014/jmb.1008.08009.
6. Shin K., Marimuthu J., Lee J.-K., Kim Y.-S. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, vol. 20 (10), pp. 1415–1423. DOI: 10.4014/jmb.1003.03031.
7. Joo A.R., Jeya M., Lee K.M., Sim W.I., Kim J.S., Kim I.W., Kim Y.S., Oh D.K., Gunasekaran P., Lee J.K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, vol. 83(2), pp. 285–294. DOI: 10.1007/s00253-009-1861-7.
8. 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.
9. Yoon J.-J., Cha Ch.-J., Kim Y.-S., Kim W. *Biotechnology Letters*, 2008, vol. 30(8), pp. 1373–1378. DOI: 10.1007/s10529-008-9715-4.
10. Gu J.-M., Park S.-S. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, vol. 41(2). DOI: 10.4014/kjmb.1301.01007.
11. Park A.R., Park J.-H., Ahn H.-J. et al. *Mycobiology*, 2015, vol. 43(1), pp. 57–62. DOI: 10.5941/MYCO.2015.43.1.57.
12. Shin K., Kim T.-J., Kim Y.-K., Kim Y.-S. *Journal of the Korean Wood Science and Technology*, 2010, vol. 38 (3), pp. 251–261. DOI: 10.5658/WOOD.2010.38.3.251.
13. Mali T., Mäki M., Hellén H. et al. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, vol. 95(9). DOI: 10.1093/femsec/fiz135.
14. Wu B., Gaskell J., Held B.W. et al. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, vol. 84(16), e00991-18. DOI: 10.1128/AEM.00991-18.
15. Park N., Park S.-Sh. *International journal of biological macromolecules*, 2014, vol. 70, pp. 583–589. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.019.
16. Park N., Park S.-S. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 37(1), pp. 62–68.
17. Purnomo A.S., Mauliddawati V.T., Khoirudin M. et al. *International journal of Environmental Science and Technology*, 2019, vol. 16, pp. 7555–7564. DOI: 10.1007/s13762-019-02484-3.
18. Tsujiyama S., Okada A. *Biotechnology Letters*, 2013, vol. 35(11), pp. 1907–1911. DOI: 10.1007/s10529-013-1281-8.
19. Pertile E., Zamarsky P. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 2020, vol. 444, 012043. DOI: 10.1088/1755-1315/444/1/012043.
20. Sariwati A., Purnomo A. S., Kamei I. *Current Microbiology*, 2017, vol. 74(4), pp. 1068–1075. DOI: 10.1007/s00284-017-1286-y.
21. Sariwati A., Purnomo A.S. *Indonesian Journal of Chemistry*, 2018, vol. 18(1), p. 75. DOI: 10.22146/ijc.25158
22. *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. Bukhalo A.S. *Vysshiyе s"yedobnyye bazidiomitsety v chistoy kul'ture*. [Higher edible Basidiomycetes in pure culture]. Kiev, 1988, 144 p. (in Russ.).
25. Riazanova T.V., Chuprova N.A., Isaeva E.V. *Wood Chemistry*, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012, 428 p.
26. Sinitsyn A.P., Gusakov A.V., Chernoglazov V.M. *Biokonversiya lignotsellyuloznykh materialov*. [Bioconversion of lignocellulosic materials]. Moscow, 1995, 224 p. (in Russ.).
27. Bradford M.M. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254.

*Received September 9, 2020*

*Accepted November 13, 2020*

**For citing:** Pavlov I.N., Litovka Yu.A., Litvinova E.A., Petrenko S.M., Enazarov R.Kh. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 4, pp. 385–394. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020048400.