

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 582.284.5 : 57.083.13

© Г. В. Ильина, Д. Ю. Ильин, Ю. С. Лыков

**РОЛЬ СПЕЦИФИКИ ЛИГНИНСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ
ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КСИЛОТРОФНЫХ ГРИБОВ IN VITRO**ILYINA G. V., ILYIN D. Yu., LYKOV Yu. S. THE SPECIFIC ROLE OF LIGNIN CONTAINING
SUBSTRATES UNDER CULTIVATION OF XYLOTROPHIC FUNGI IN VITRO

Современным направлением прикладных микологических исследований является поиск оптимальных условий для культивирования, а также всестороннее изучение физиологии и биохимии ксилотрофных грибов, перспективных в качестве продуцентов биологически активных веществ. В пределах названной экологической группы особое место занимают грибы белой гнили, обладающие спектром лигнинразрушающих ферментов. Известно, что разнообразное сочетание ферментных комплексов грибов связано в первую очередь с экологическими особенностями последних, их трофической специализацией и является следствием длительной эволюции (Решетникова, 1997). В процессе микробиологического разложения субстратов, содержащих лигнин, образуются разнообразные соединения фенольной и нефенольной природы. В связи с этим в настоящее время проводится активное изучение микробиологической деградации лигнина (Kelley, 1992; Бабицкая, 1994; Варнайте, Раудонене, 2008). Актуальность этого направления продиктована возможностью использования продуктов его неполного распада как непосредственно, так и в качестве сырья в органическом синтезе, в производстве белково-витаминного концентрата (Головлева и др., 1982). Большинство исследований, проводившихся в этой сфере, в основе своей посвящено выяснению особенностей ферментативной деструкции нативного лигнина, факторов, влияющих на этот процесс, а также возможностей получения ценных продуктов. Сведения, касающиеся значения разных форм лигнина в качестве трофического фактора для чистых культур, в настоящее время довольно ограничены. Однако подобная информация способна пролить свет на некоторые малоизученные, частные стороны развития чистых культур лигнинразрушающих грибов, что, безусловно, раскроет новые возможности использования последних в биотехнологии. В этом плане интерес представляют относительно ранние работы, посвященные общим вопросам строения, биосинтеза и биодеструкции молекулы лигнина. Некоторые данные, полученные в результате таких исследований, заслуживают внимания в плане оценки влияния разных форм лигнина и его структурных единиц с разной степенью конденсации на рост и процессы метаболизма мицелиальных культур.

Согласно современным взглядам, формирование молекулы лигнина идет путем спонтанного взаимодействия синтезируемых растением радикалов, которые являются структурными блоками нестереорегулярной молекулы. Природный лигнин не характеризуется регулярностью структуры и качественного состава молекулы, но широко известным фактом является то, что его мономерными звеньями служат фенилпропановые единицы, представляющие собой производные гваяцилпропана, синригилпропана и гидроксифенилпропана. Эти структуры различаются между собой в первую

очередь количеством фенильных метоксильных групп. В частности, гваяцилпропановые единицы характеризуются содержанием одной, сиригилпропановые — двух метоксильных групп. Гидроксифенилпропановые единицы не содержат таковых. Известно, что деструкция древесины, осуществляемая грибами белой гнили, предполагает разрушение лигнина и на первых этапах связана с вовлечением в цикл биохимических превращений именно этих функциональных группировок (Фенгел, Вегенер, 1988). Исследования, ведущиеся с 70-х годов XX в. с использованием меченого углерода в составе модельных соединений лигнина, показывают, что конечный продукт метаболизма CO_2 в основном образуется из углерода метоксильных групп и в небольшой степени из углерода пропановых цепей и ароматических колец. При этом расщепление полимерного комплекса лигнина начинается с периферии макромолекулы (Kirk et al., 1977). Таким образом, темпы процесса ферментативного расщепления молекулы лигнина зависят от степени ее конденсации. По этой причине представляется целесообразным поиск способов предварительной подготовки лигнинсодержащего субстрата, способной повысить доступность тех компонентов лигнина, которые являются трофически значимыми для мицелиальных культур ксилотрофных грибов. Такими компонентами, как следует из приведенных литературных источников, являются, в частности, метоксильные группы.

В этом контексте совершенствование рецептур субстратов для выращивания и хранения чистых культур грибов-ксилотрофов, в частности грибов белой гнили, необходимо для максимально полного выявления потенциала последних (Ильина, Лыков, 2008). Это предусматривает изучение всех сторон использования в качестве компонентов питательных сред различных типов и форм лигнина.

Цель настоящей работы — изучение особенностей развития мицелиальных культур базидиальных макромицетов-ксилотрофов на питательных средах, содержащих источники лигнина с разной степенью конденсации молекулы. Интерес представляет исследование показателей интенсивности метаболизма мицелиальных культур, а также значения дополнительных, прежде всего трофических, факторов, способных модифицировать этот процесс. В этой связи задачами являлось: создание субстратов, содержащих разные формы лигнина, причем одна из них должна была быть получена в ходе предварительной обработки с целью увеличения количества метоксильных групп, а также расщепления молекулы на олигомерные фрагменты; поиск косвенных факторов, способствующих вовлечению этих продуктов в метаболические реакции в мицелии; выявление видовых и штаммовых особенностей культур, связанных с развитием на лигнинсодержащих субстратах в различных вариантах опытов.

Материал и методы

Материалом для исследований стали штаммы ксилотрофных базидиомицетов из коллекции культур кафедры биологии и экологии ФГОУ ВПО «Пензенская ГСХА» следующих видов: *Stereum hirsutum* (Willd. ex Fr.) S. F.Gray, *Fomitopsis pinicola* (Fr.) Karst., *Fomes fomentarius* (L. : Fr.) Gill., *Ganoderma applanatum* (Wallr.) Pat., *Schizophyllum commune* (Fr.) Fr., *Laetiporus sulphureus* (Bull. : Fr.) Bond. et Sing., выделенные из плодовых тел с территории Пензенской и Саратовской областей, а также три штамма *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst., любезно предоставленные кафедрой микологии и альгологии МГУ им. М. В. Ломоносова.

Плотной питательной средой служил картофельно-глюкозный агар (КГА). В качестве жидкой питательной среды для глубинного культивирования использовали среду Чапека. Контрольные варианты опыта не предусматривали внесения в плотные питательные среды лигнинсодержащих материалов. В качестве источника лигнина использовали дубовые опилки. Первый вариант опыта предполагал внесение в питательную среду опилок механического размола (источник нативного лигнина) в количестве 2 % от массы среды. Второй вариант опыта был связан с использованием опилок, подвергшихся метанолизу. Метанолиз — предварительная подготовка лиг-

нинсодержащего материала в модификации авторов (Закис, 1987). Для его осуществления высушенные в условиях вакуумного шкафа опилки экстрагировали в смеси этанола и бензола. Затем опилки заливали 0.5%-м раствором хлороводорода в метаноле в присутствии небольшого количества диметоксипропана. В таком виде материал выдерживали в течение 5 суток. Следующим этапом было высушивание опилок для удаления следов метанола. Подготовленные опилки вносили в питательные среды в количестве, аналогичном первому варианту опыта. При этом исходный материал для получения обеих форм источников лигнина имел идентичное происхождение, а перед внесением в субстраты был дифференцирован на одинаковые фракции, что исключает возможные артефакты. В ходе эксперимента было проведено сравнение темпов и особенностей роста мицелиальных культур на плотных питательных средах. При этом учитывали скорость роста культур, длительность разных фаз развития, качественные показатели активности дегидрогеназ (на основе индикаторных свойств восстановленного нитросинего тетразолия). Нитросиний тетразолий обладает свойством акцептировать отщепленные дегидрогеназами электроны и, восстанавливаясь, превращаться в ярко окрашенный формазан (Барыкина и др., 2000). Краситель вносили в среду в концентрации 0.001 г/л. Интенсивность окраски оценивали с использованием пятибалльной шкалы, где 1 балл соответствует слабой, едва заметной окраске, 2 балла — слабой, 3 — средней, 4 — сильной, 5 баллов — насыщенной, интенсивной окраске.

Особый интерес представляло выяснение сопутствующей роли парааминобензойной кислоты (ПАБК) в процессе деградации лигнина, для чего был проведен отдельный эксперимент. Фолиевая кислота, предшественником которой служит ПАБК, участвует в переносе одноуглеродных радикалов, что может иметь немаловажное значение в процессе утилизации метоксильных групп лигнина культурой гриба. Для установления эссенциальной роли ПАБК использовали ее токсический аналог — сульфаниламид (СА) (Овчинников, 1987). Вещества вносили в питательную среду в одинаковой концентрации 0.005 г/л.

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов установлено, что особенности подготовки лигнинсодержащего субстрата имеют существенное значение. Исходя из особенностей роста культур, можно судить о том, что метанолизные опилки являются более доступным субстратом, поскольку выступают как фактор, положительно влияющий на развитие. В первом варианте опыта (внесение опилок механического размола в КГА) существенных отличий от контроля (КГА) выявлено не было. Во втором варианте (метанолизные опилки, КГА) следует отметить достоверный факт стимуляции роста всех штаммов *Fomes fomentarius*, а также штаммов *Ganoderma lucidum* М-1 и М-6 (см. таблицу). Кроме того, в этом случае установлено влияние метанолизных опилок на динамику развития мицелия. Так, продолжительность фазы адаптации к субстрату (lag-фаза) была на одном уровне в опытном и контрольном вариантах. Однако продолжительность трофической фазы и ее интенсивность в опыте существенно отличались от контрольных показателей (рис. 1).

При инокуляции посевного мицелия *Ganoderma lucidum*, выращенного на средах, содержащих метанолизные опилки, в среды для глубинного культивирования было установлено, что фаза адаптации в этом случае проходит значительно быстрее, чем в контрольных вариантах: формирование пеллет начинается уже через 20—22 ч глубинного роста, а в контроле не ранее, чем через 36 ч. Этот факт, безусловно, представляет интерес с практических позиций и требует тщательного изучения.

Дегидрогеназная активность как показатель интенсивности обменных процессов культур в первом и втором вариантах опыта была изучена в эксперименте с использованием нитросинего тетразолия. В качестве объекта исследования были использова-

Скорость роста штаммов ксилотрофных базидиомицетов на плотных питательных средах с добавлением опилок (24 °С)

Вид	Штамм	Питательные среды		
		КГА, опилки механического размола	КГА, опилки метанолизные	КГА (контроль)
<i>Fomes fomentarius</i>	Kn-07	12.2 ± 0.3	12.8 ± 0.1	12.0 ± 0.2
	Lp-06	12.6 ± 0.7	12.9 ± 0.2	11.8 ± 0.3
	Ln-16	11.7 ± 0.6	12.2 ± 0.3	11.2 ± 0.3
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Ah-05	11.1 ± 0.1	11.2 ± 0.3	11.0 ± 0.2
	Ah-06	11.9 ± 0.9	12.0 ± 0.2	11.2 ± 0.1
	PD-05	11.7 ± 0.7	11.9 ± 0.2	11.6 ± 0.2
<i>Ganoderma applanatum</i>	G-1	12.0 ± 0.8	12.3 ± 0.3	12.2 ± 0.1
	G-2	7.3 ± 0.9	9.7 ± 0.1	9.2 ± 0.4
	PO-05	10.2 ± 0.2	11.2 ± 0.2	10.4 ± 0.3
<i>Ganoderma lucidum</i>	M-1	4.7 ± 0.8	6.0 ± 0.3	7.3 ± 0.7
	M-3	12.0 ± 0.2	12.3 ± 0.1	10.3 ± 0.5
	M-6	7.1 ± 0.4	8.9 ± 0.1	4.1 ± 0.3
<i>Schizophyllum commune</i>	N-07	5.7 ± 0.3	5.9 ± 0.4	6.8 ± 0.4
	Ln-10	8.9 ± 0.7	9.9 ± 0.4	6.6 ± 0.2
	Ln-23	7.0 ± 0.3	7.3 ± 0.9	7.1 ± 0.2
<i>Stereum hirsutum</i>	St-1	1.3 ± 0.1	5.2 ± 0.3	4.8 ± 0.5
	St-2	8.2 ± 0.1	8.2 ± 0.4	6.2 ± 0.1
	St-3	8.2 ± 0.2	9.0 ± 0.4	8.9 ± 0.2
<i>Fomitopsis pinicola</i>	N-F1	3.2 ± 0.1	3.1 ± 0.3	3.2 ± 0.3
	N-F2	3.6 ± 0.3	3.8 ± 0.7	4.5 ± 0.4
	N-F1	5.7 ± 0.9	5.2 ± 0.3	5.3 ± 0.3

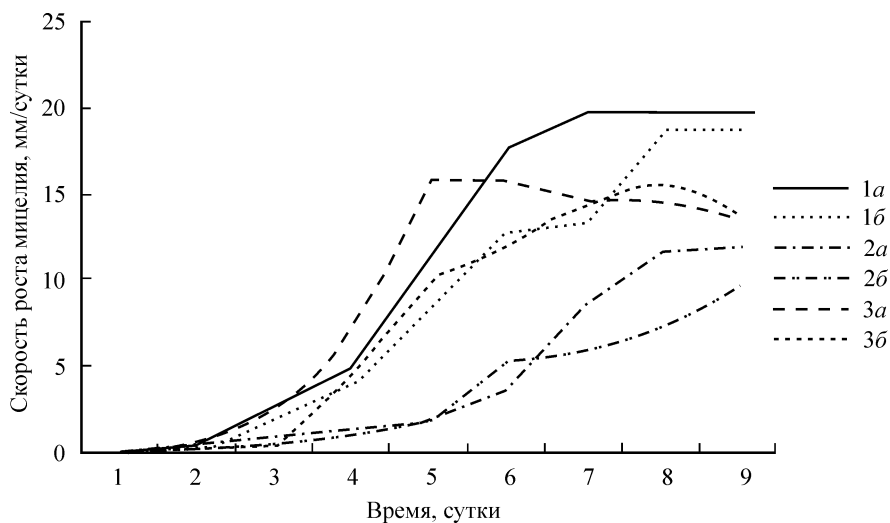


Рис. 1. Динамика роста мицелия грибов на плотной питательной среде, содержащей метанолизные опилки (24 °С).

a — КГА (метанолизные опилки), *б* — КГА (контроль); 1 — *Fomes fomentarius*, штамм Ln-16, 2 — *Laetiporus sulphureus*, штамм PD-05, 3 — *Stereum hirsutum*, штамм St-3.

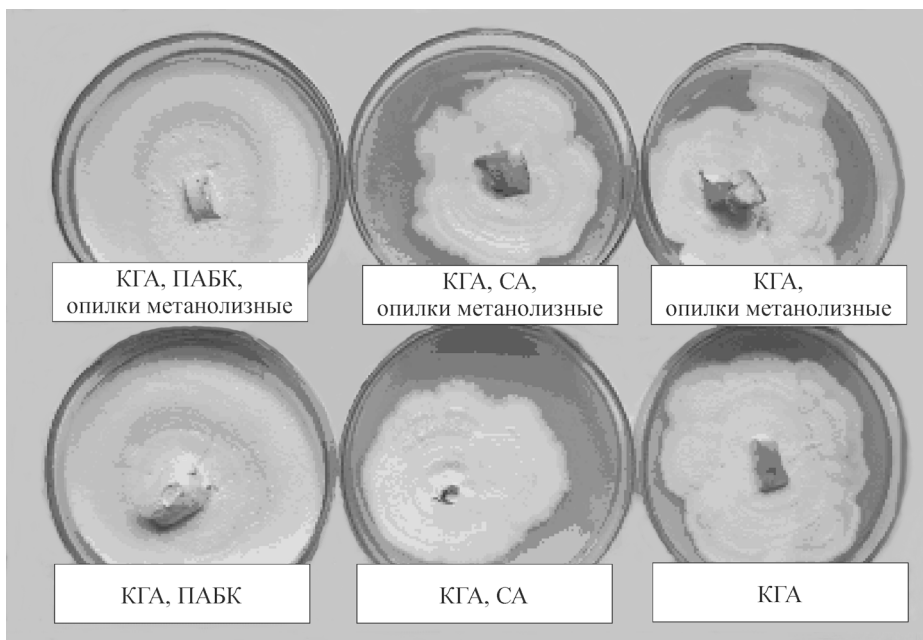


Рис. 2. Рост мицелия *Ganoderma applanatum* (штамм РО-05) на 7-е сутки культивирования на различных средах.

КГА — картофельно-глюкозный агар, ПАБК — парааминбензойная кислота, СА — сульфаниламид.

ны наиболее быстрорастущие штаммы *Fomes fomentarius* с позитивной реакцией на внесение в среду лигнинсодержащих компонентов. Визуально, по степени окраски, установлено, что дыхательная активность мицелия, о которой свидетельствует работа дегидрогеназ, существенно выше в случае добавления в среду метанолизных опилок (второй вариант опыта). При этом отмечено наиболее интенсивное и равномерное окрашивание, оцененное в 4 балла по шкале, описанной выше. В варианте с опилками механического размола интенсивность окрашивания оценена в 3 балла, оно развивалось медленнее и менее равномерно. В контрольном варианте окрашивание было еще менее интенсивным (2 балла), его проявление запаздывало по сравнению с опытными вариантами. Это указывает на то, что кроме сахаров, входящих в состав питательной среды КГА, источником углерода в опытных вариантах служит и материал опилок. Факт наиболее активной работы дегидрогеназ в варианте с метанолизными опилками обусловлен именно состоянием лигнина в материале, подготовленном таким образом. Метанолиз практически не сказывался на состоянии целлюлозы, которая в этом случае оставалась доступной культуре в равной мере в обоих опытных вариантах. При этом целлюлоза оставалась источником углерода, способным включаться в процессы диссимиляции.

При изучении влияния ПАБК на трофический потенциал мицелиальных культур было заложено четыре опытных и два контрольных варианта. О роли ПАБК судили на основании результатов исследований скорости и характера роста мицелия штаммов *Ganoderma applanatum* на средах с ПАБК (первый вариант), с ПАБК и метанолизными опилками (второй вариант), в сравнении с добавлением СА (третий вариант), СА и метанолизными опилками (четвертый вариант) и контрольными вариантами (КГА, КГА и метанолизные опилки). На первых этапах развития мицелия скорость роста культур была практически одинаковой в опытных и контрольных вариантах, однако на 6-е сутки рост в вариантах с добавлением СА прекратился на фоне заметного увеличения скорости роста в варианте с ПАБК и метанолизными опилками и с замедлением в контрольных вариантах (рис. 2). Среда, содержащая метанолизные опилки и

ПАБК, была полностью освоена уже на 7-е сутки, содержащая только ПАБК — на 8-е. Рост на среде, содержащей СА, прекратился, а в контрольных вариантах освоение субстрата было завершено на 8-е и 9-е сутки роста соответственно. Это подтверждает предположение о роли и месте ПАБК в метаболических процессах микроорганизмов, и в частности грибов, как эссенциального ростового фактора.

Таким образом, результаты серии экспериментов, проведенных с целью определения роли лигнинсодержащих компонентов питательных сред, свидетельствуют о целесообразности поиска путей и способов подготовки материала, предназначенного для оптимизации роста культур. Гидролиз лигнина, проводимый с использованием большинства принятых методик применительно к его использованию в качестве компонента питательных субстратов, не обеспечивает устойчивой деструкции, которая обеспечивала бы доступность метоксильных группировок. Процедура высокотемпературной стерилизации субстрата всегда способствует обратной конденсации, что ведет к образованию вторичного лигнина, отличающегося по структуре от нативного. Метанолизный лигнин характеризуется тем, что содержит большое количество лигнанов — олигомерных компонентов лигнина. Эти компоненты модифицированы дополнительными метоксильными группами, которые препятствуют процессу обратной конденсации при высоких температурах. Такой материал служит более доступным субстратом, что представляет определенную ценность при работе *in vitro* с организмами, для которых этот трофический фактор может определять максимальное раскрытие их природного потенциала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бабицкая В. Г. Ферментативная деградация лигнина, содержащегося в растительных субстратах, мицелиальными грибами // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 30, вып. 6. С. 827—835.

Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятов А. Г., Джалилова Х. Х., Ильина Г. М., Чубатова Н. В. Основы микротехнических исследований в ботанике. Справочное руководство. М.: МГУ, 2000. 127 с.

Варнайте Р. Н., Раудонене В. З. Ферментативное разложение лигнина в соломе ржи микромицетами в разных комбинациях // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42, вып. 2. С. 167—172.

Головлева Л. А., Ганбаров Х. Г., Скрыбин Г. К. Разложение лигнина грибными культурами // Микробиология. 1982. № 51. С. 543—547.

Закис Г. Ф. Функциональный анализ лигнинов и их производных. Рига: Зинатне, 1987. 230 с.

Ильина Г. В., Лыков Ю. С. Особенности роста штаммов ксилотрофных базидиомицетов на плотных питательных средах различного состава // II съезд микологов России «Современная микология в России»: Тез. докл. М., 2008. С. 509—510.

Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.

Решетникова И. А. Деструкция лигнина ксилотрофными макромицетами. Накопление селена и фракционирование его изотопов микроорганизмами. М.: Новинтех-Пресс, 1997. 197 с.

Фенгел Д., Вегенер Г. Древесина (химия, ультраструктура, реакции). Пер. с англ. М.: Лесная пром-сть, 1988. 512 с.

Kelley J. Upgrading of Waste Cereal Straws // Outlook of Agriculture. 1992. Vol. 21. P. 105—108.

Kirk T. K., Connors W. J., Zeikus J. G. Advances in understanding the microbiological degradation of lignin. Structure, Biosynthesis and Degradation of wood. New York: Plenum Press, 1977. P. 369—394.

РЕЗЮМЕ

Исследовали специфические особенности роста некоторых разновидностей штаммов ксилотрофных базидиомицетов на питательной среде, содержащей источники лигнина. Изучена роль 4-аминобензойной кислоты как фактора активизации метаболизма, а также влияние субстратов, содержащих источники лигнина, на активность дегидрогеназ.

Ключевые слова: ксилотрофные базидиомицеты, лигнин, 4-аминобензойная кислота.

SUMMARY

The specific growth features of some variety strains of xylophilic basidiomycetes on the nutrient medium containing lignin sources were investigated. The role 4-aminobenzoic acid as factor of metabolism activation was examined. The influence of substrates containing lignin sources on activity of dehydrogenases was studied.

Key words: xylophilic basidiomycetes, lignin, 4-aminobenzoic acid.