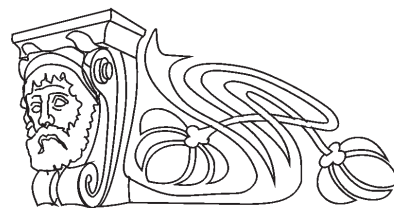




УДК 579.66. 504.06

## ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ГРИБА *LENTINUS (PANUS) TIGRINUS* НА ДРЕВЕСНЫЕ ОТХОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОКОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ



В. В. Шутова, В. В. Ревин, Т. В. Кудяева

Мордовский государственный университет  
E-mail: vshutova@yandex.ru

Проведено глубинное культивирование гриба *Lentinus (Panus) tigrinus* в средах с древесными отходами – сосновыми и березовыми опилками. Более значительная убыль лигнина и целлюлозы наблюдалась при использовании березовых опилок. Деградация лигнина в обоих случаях выражена больше, чем целлюлозы. Активность лигнолитических ферментов коррелировала с потреблением лигнина. Максимальная активность лакказы отмечена в среде с 3% березовых опилок, Мп-пероксидазы – в среде с 5% субстрата. Получены биокomпозиционные материалы на основе биомодифицированных древесных отходов.

**Ключевые слова:** *Lentinus (Panus) tigrinus*, лигнолитические грибы, глубинное культивирование, березовые и сосновые опилки, лигнин, целлюлоза.

### Study of the Fungus *Lentinus (Panus) Tigrinus* on Wood Waste Used to Produce the Bio-composite Materials

V. V. Shutova, V. V. Revyn, T. V. Kudayeva

Submerged cultivation of the fungus *Lentinus (Panus) tigrinus* in the media with waste wood – pine and birch sawdust was conducted. A more significant decrease of lignin and cellulose was observed with the use of birch sawdust. Degradation of lignin in both cases expressed in more than cellulose. Activity lignolytic enzymes correlated with the consumption of lignin. Maximum laccase activity observed in the medium with 3% birch sawdust, Mn-peroxidase – in a medium with 5% of the substrate. Biocomposite materials were manufactured based on the modified wood waste.

**Key words:** *Lentinus (Panus) tigrinus*, lignolytic fungi, submerged cultivation, birch and pine sawdust, lignin, cellulose.

В настоящее время на лесоперерабатывающих предприятиях страны образуется много древесных отходов, которые способны загрязнять окружающую среду, с другой стороны, на их основе можно получать ценные продукты. Одним из вариантов использования таких отходов является производство древесно-стружечных плит. Альтернативой традиционным технологиям их производства может служить биотехнологический способ, заключающийся в предварительной биомодификации древесины грибами, вызывающими «белую гниль» [1]. Лигнолитические грибы способны переводить

лигнин, являющийся своего рода клеем в нативной древесине, в активное состояние и производить разрыв лигнин-углеводных связей, высвобождая функциональные группы лигнина [2]. Традиционным способом выращивания грибов является твердофазное культивирование на растительных субстратах. Но этот способ очень дорог и не гарантирует безопасности для человека и окружающей среды. Наиболее эффективным является глубинное культивирование, способствующее быстрому и продуктивному росту грибов. Кроме того, выращивание высших грибов в глубинной культуре позволяет значительно интенсифицировать процесс и сделать его экологически безопасным.

Микроорганизмы, относящиеся к группе грибов «белой гнили», обладают способностью разрушать молекулы лигнина – одного из самых труднодеградируемых биополимеров в природе [3]. Прямое окисление полимерного лигнина осуществляется внеклеточными ферментами, обычно – это лигнинпероксидаза, Мп-пероксидаза и лакказы [2]. Способность лигнолитических базидиомицетов продуцировать лакказу считается характерным признаком лигнолитических грибов, отличающим их от других дереворазрушающих грибов, не способных разлагать лигнин. Пероксидазы, выделенные из различных грибов, даже очень близких таксономически, значительно различаются по своим физико-химическим свойствам, по субстратной специфичности и по степени участия в биодеградации лигнина. По мнению ряда авторов, пероксидаза обладает более широким субстратным спектром, чем другие ферменты лигнолитического комплекса. Лакказу используют для детоксикации сточных вод [4], в иммуноферментном анализе, производстве композиционных материалов [5].

В работе мы исследовали изменение основных компонентов березовых и сосновых опилок при глубинном культивировании на них *Lentinus (Panus) tigrinus*, а также его лигнолитическую активность.



### Материалы и методика

Гриб *Lentinus (Panus) tigrinus* штамм 317 (ВКМ F-3616 D), разрушающий лигнин, выделен и селекционирован на кафедре биотехнологии Мордовского госуниверситета и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов.

Посевной материал выращивали в колбах объемом 250 мл при 27 °С в глубинных условиях на среде Чапека–Докса следующего состава (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,22; рН – 6,0; с лигносульфонатом (15 г/л) и сахарозой (20 г/л).

При глубинном культивировании навески субстратов (3, 5 и 7% к объему) помещали в колбы Эрлеймейера со 100 мл среды и стерилизовали 30 мин при 120 °С. Затем инокулировали 10 мл четырехсуточной культуры *L. tigrinus*. Культивирование гриба вели на качалке при температуре 25–26 °С и 200 об/мин. По окончании культивирования субстрат высушивали до постоянной массы при 105 °С и изучали химический состав древесных опилок.

Общее содержание лигнина в опилках до и после воздействия гриба определяли весовым методом [6]. Количество редуцирующих сахаров определяли по реакции с пикриновой кислотой, целлюлозы – по методу, описанному в работе [7], белка – по методу [8].

Лакказную активность в культуральной жидкости регистрировали по начальной скорости окисления пирокатехина при 410 нм [9]. За единицу активности принимали количество фермента, которое за 1 мин при 30 °С образует 1 мкмоль продукта.  $\text{Mn}^{2+}$ -пероксидазную активность определяли по окислению фенолового красного [10].

### Результаты и их обсуждение

Выращивание гриба *Lentinus (Panus) tigrinus* ВКМ F-3616 D вели в колбах в среде Чапека–Докса с добавлением березовых и сосновых опилок. В среде содержалось много легкоусвояемых сахаров (30 г/л сахарозы), что обеспечило высокое количество биомассы.

Хороший рост гриба был обнаружен в среде с опилками березы и сосны в концентрации 3 и 5%, однако 7% субстрата в среде практически полностью подавляли рост *L. tigrinus*. К третьим суткам были видны единичные пеллеты диаметром 1 мм.

Расщепление целлюлозы осуществляется гидролитическими ферментами – эндо- и экзоглюканазами, целлобиогидролазами и целлобиазами. Они способны расщеплять трудноусвояемые

нативные молекулы целлюлозы до низкомолекулярных фрагментов – целлобиозы, глюкозы и т. д.

Количество целлюлозы снижалось в течение всего срока культивирования (рис. 1, а). Исключением были варианты с концентрацией опилок 7%, где изменения содержания целлюлозы не наблюдалось. Видимо, такая высокая концентрация опилок ингибирует рост гриба, продукцию целлюлолитических ферментов или их активность.

При культивировании на опилках березы с 3% концентрацией уже на 3-и сутки потребление целлюлозы было очень значительным и достигало 19,8%. При увеличении концентрации опилок до 5% на 3-е сутки убыль целлюлозы была невысокой, хотя к 12-м суткам в данном варианте она практически достигала значения варианта с 3% субстрата и составляла 29,2%.

В сосновых опилках целлюлоза потреблялась грибом несколько хуже.

Более значительную убыль целлюлозы древесины березы можно объяснить тем, что гриб лучше растет на древесине лиственных пород. В литературных источниках показано, что естественным субстратом для роста гриба *L. tigrinus* являются лиственные деревья [11].

Таким образом, наибольшее потребление целлюлозы при глубинном культивировании гриба *L. tigrinus* наблюдалось при использовании березовых опилок в концентрации 3%.

Лигнин представляет собой вещество, которое очень трудно подвергается биодegradации. Гриб *L. tigrinus* способен расщеплять лигнинный компонент древесины за счет действия необычного комплекса лигнолитических ферментов, включающий  $\text{Mn}$ -зависимую пероксидазу и лакказу. Известно, что биодegradация лигнина базидиомицетами зависит от активности лигнолитических ферментов и интенсивности роста гриба.

Снижение содержания лигнина наблюдалось во всех вариантах на протяжении заданного времени культивирования, кроме случая с 7% субстрата (рис. 1, б), где, как и в случае с целлюлозой, изменения компонента не наблюдалось.

Максимальное потребление лигнина было в среде с березовыми опилками в концентрации 5% (58,1% к 12-м суткам), менее значительное – зафиксировано в варианте с древесиной сосны в концентрации 5% (20,3%). Лигнин березовых опилок более доступен ферментам гриба, поэтому убыль его была больше.

При сравнении данных по потреблению лигнина с данными по потреблению целлюлозы можно отметить, что процесс разложения лигнина данным грибом преобладает над разложением целлюлозы.

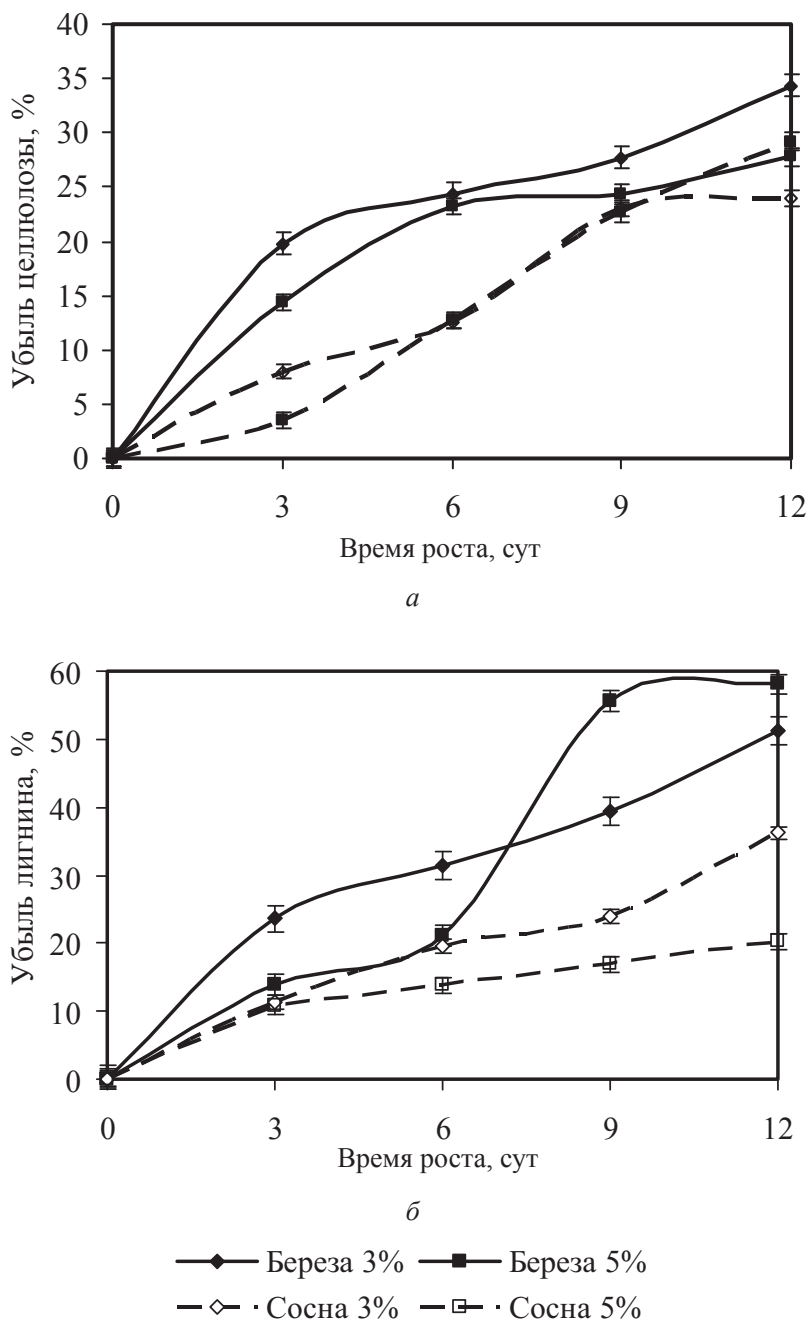


Рис. 1. Убыль целлюлозы (а) и лигнина (б) при росте *L. tigrinus* в среде с древесными опилками

Хотя данные литературных источников говорят о том, что на первых этапах грибы разлагают полисахариды [12], в нашем случае лигнин разлагался на самых ранних этапах роста. Очевидно, что гриб *L. tigrinus* является активным лигнолитическим грибом, который преимущественно потребляет лигнин и в меньшей степени целлюлозу.

Для активного роста дереворазрушающих грибов требуется источник углеводов. В древесине им, прежде всего, служат свободные сахара и

легкогидролизуемые гемицеллюлозы. В процессе роста лигнинразрушающие грибы первоначально потребляют свободные сахара и производят гидролиз полисахаридов до моносахаридов, которые затем утилизируются грибами.

Содержание редуцирующих веществ в среде с опилками в концентрации 3 и 5% повышалось с третьих по двенадцатые сутки и достигало 1,2 – 1,25 мг/мл у березы и 0,91 – 0,96 мг/мл у сосны (рис. 2, а). Увеличение редуцирующих сахаров

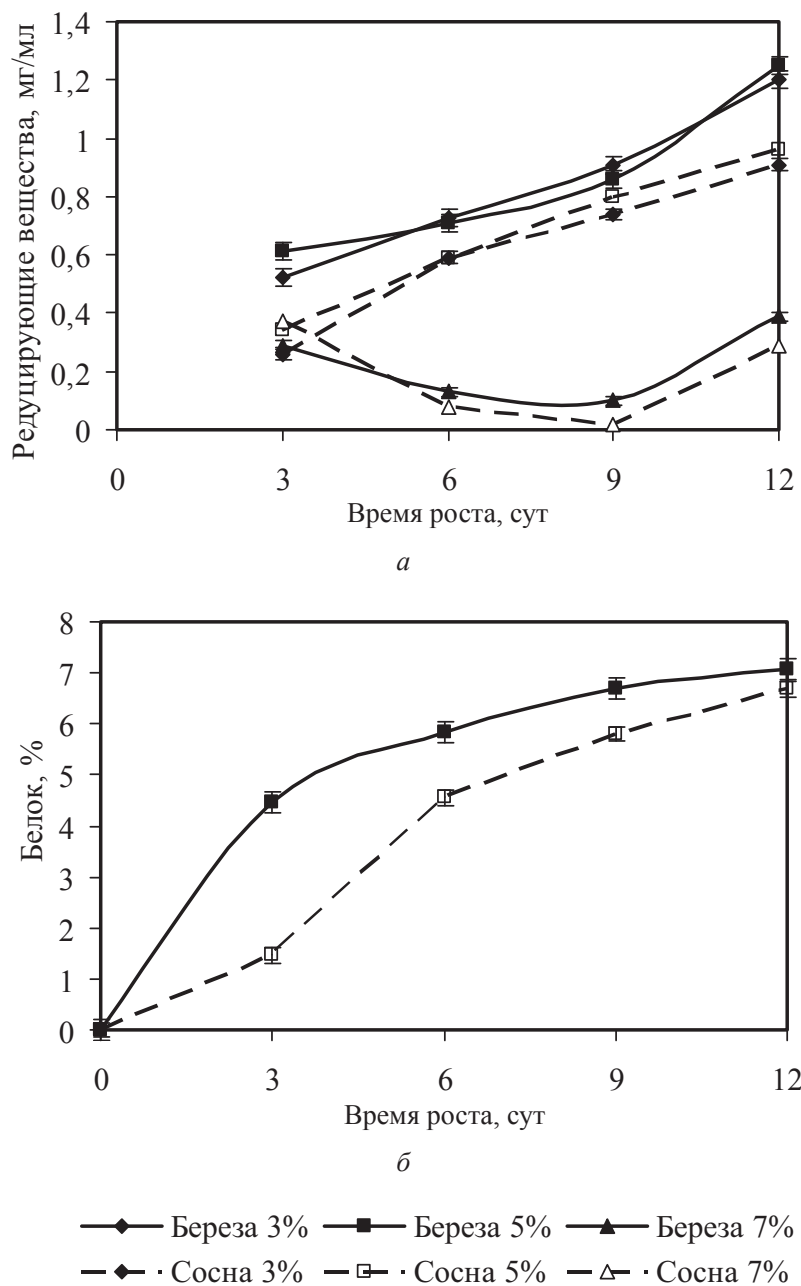


Рис. 2. Динамика редуцирующих сахаров (а) и белка (б) при росте *L. tigrinus* в среде с древесными опилками

можно объяснить тем, что на протяжении всего времени культивирования целлюлоза претерпевала деструкцию грибными ферментами, что способствовало активному ее разрушению. В результате разрушения целлюлозы в среде образовывались продукты ее гидролиза, в частности целлобиоза и глюкоза, которые накапливались в среде.

В варианте с концентрацией опилок 7% наблюдалось снижение редуцирующих сахаров с 3-х по 9-е сутки с 0,29 до 0,1 мг/мл у березы и с 0,37 до 0,02 мг/мл у сосны. На 12-е сутки про-

исходило повышение их количества. Поскольку рост на среде с 7% растительного субстрата был крайне скудным, можно предположить, что он происходил за счет сахаров среды, с чем и связано уменьшение количества редуцирующих веществ. Так как слабый рост на среде с 7% опилок все же наблюдался, то в процессе роста он мог выделять в среду литические ферменты, которые разрушали полисахариды опилок, в результате чего количество редуцирующих веществ к 12-м суткам несколько возросло.



Составной частью мицелия дереворазрушающих грибов являются белки и полисахариды. Клеточные оболочки состоят из хитина (азотсодержащего полисахарида, аналога целлюлозы), соединений типа гемицеллюлоз и их метилированных производных, а также пектиновых и лигноподобных веществ. Количество биомассы оценивали по содержанию белка, так как оно относительно постоянно для мицелия грибов и составляет, по литературным данным, у разных грибов «белой гнили» от 25 до 47% на сухой вес гриба [13].

При содержании субстрата 3 и 5% получены практически одинаковые значения белка, поэтому на рис. 2, б представлена динамика только для 5%. При глубинном культивировании *L. tigrinus* лучший рост наблюдался в среде с 3 и 5% березовых опилок, где содержание белка составило к 12-м суткам 7,1%. В варианте с 3 и 5% опилок сосны количество белка к этому времени увеличилось до

6,6–6,7%. Активный рост базидиомицета в случае использования березовых опилок начался раньше. И в том и другом варианте накопление белка происходило вплоть до 12 суток. При концентрации опилок в среде 7% используемым методом белок обнаружен не был.

Максимумы лакказной активности, определяемой по пирокатехину, в средах с содержанием березовых опилок 3 и 5% наблюдались на 3-и сутки роста, после чего происходило ее снижение. Позже проявлялся второй пик, однако он не достигал уровня первого. Несмотря на отсутствие заметного изменения количества лигнина в субстрате при концентрации опилок 7%, лакказная активность гриба была достаточно высокой. Ее максимум лишь отодвигался к 6-м суткам и был единственным (рис. 3). Наибольшая активность фермента была зафиксирована на среде с 3% березовых опилок, на 3-и сутки роста она составила 38,3 ед/мл.

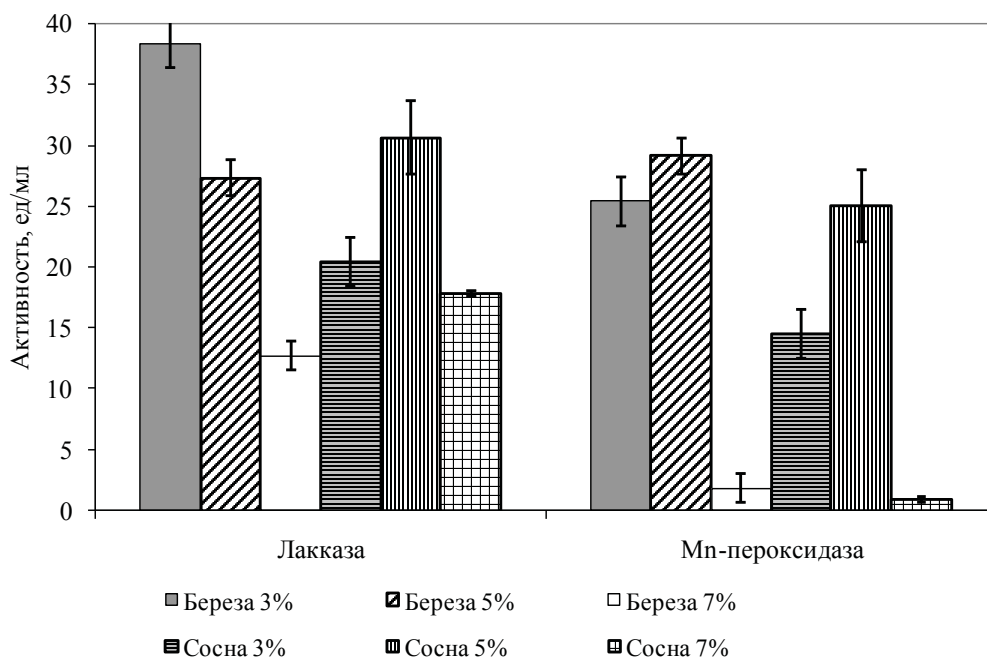


Рис. 3. Максимальные значения активности лигнолитических ферментов *L. tigrinus* в среде с древесными опилками

На сосновых опилках при всех концентрациях максимумы активности лакказы наблюдались на 3-и сутки, а на 9-е сутки был обнаружен второй пик. Самая высокая лакказная активность отмечена на среде с 5% субстрата, но она была ниже – 30,6 ед/мл. *L. tigrinus* является видом, который растет преимущественно на лиственных породах деревьев, в связи с чем, вероятно, было отмечено снижение абсолютных значений активности на среде с сосновыми опилками.

Известно, что лигнолитический комплекс *L. tigrinus* включает лакказу, Mn-зависимую пероксидазу и пероксидазу растительного типа [14, 15], поэтому мы также изучали активность Mn-пероксидазы, зависящую от ионов марганца. Начальным субстратом фермента является  $Mn^{+2}$ , который преобразуется в высокорекреакционный  $Mn^{+3}$ -хелатный комплекс, способный окислять многие фенольные субстраты. Mn-пероксидазную активность *L. tigrinus* на средах с опилками ис-



следовали по окислению фенолового красного в присутствии  $Mn^{+2}$  и пероксида водорода.

При выращивании на березовых опилках наблюдали примерно одинаковые динамики проявления активности фермента на средах с 3 и 5% субстрата. На 3-и сутки активность была высокой, затем наблюдалось ее снижение, и к 12-м суткам она резко возростала, причем в среде с 3% опилок даже превысила уровень 3-х суток. Возможно, это связано с тем, что функция Mn-пероксидазы заключается в окислении фенольных субстратов, включая фенольные лигниновые соединения [16], а их количество может возрасти в результате действия лакказы, максимум активности которой зафиксирован на 3-и сутки.

На сосновых опилках пики при всех концентрациях наблюдались на 3-и сутки, а на 9-е сутки был отмечен второй пик. Самая высокая Mn-пероксидазная активность зафиксирована на среде с 5% субстрата (25 ед/мл).

Таким образом, активность лигнолитических ферментов коррелировала с потреблением лигнина. Максимальная активность лакказы и Mn-пероксидазы отмечена на среде с березовыми опилками в концентрации 3–5%.

Микробиологическая трансформация древесной массы в заданном направлении открывает новый путь создания экологически чистых плит, так как использование в строительной биотехнологии широко распространенных в природе грибов «белой гнили», относящихся к съедобным видам, не представляет угрозы для человека. При этом устраняется главный недостаток традиционных технологий – использование токсичных для человека синтетических смол и отвердителей.

Мы изготовили композиционные материалы путем прессования высушенных биомодифицированных сосновых опилок. Предварительная обработка инокулятом гриба увеличивает прочность при статическом изгибе биоконструктивов от 7,8 МПа до 18,8 МПа при оптимальном режиме прессования. Полученные древесно-стружечные плиты можно использовать в качестве конструкционного материала после ламинирования или введения гидрофобных компонентов с целью снижения их высокой гидрофильности.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (госконтракт № 11.519.11.5019 от 28.10.2011).*

### Список литературы

1. Ревин В. В., Кадималиев Д. А., Шутова В. В., Самуилов В. Д. Модификация лигнина древесины грибом *Panus tigrinus* // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 38, № 5. С. 529–533.
2. Ревин В. В., Шутова В. В., Кадималиев Д. А., Атыкян Н. А., Ведяшкина Т. А., Ивинкина Т. И. Теоретические и прикладные основы получения биокомпозиционных материалов с помощью биологических связующих. Саранск, 2010. 280 с.
3. Dashtban M., Schraft H., Syed T. A., Qin W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin // Intern. J. Biochem. Mol. Biol. 2010. Vol. 1, № 1. P. 36–50.
4. Babic J., Likozar Bl., Pavko Al. Optimization of ligninolytic enzyme activity and production rate with *Ceriporiopsis subvermispora* for application in bioremediation by varying submerged media composition and growth immobilization support // Intern. J. Mol. Sci. 2012. Vol. 13, № 9. P. 11365–11384.
5. Hüttermann A., Mai C., Kharazipour A. Modification of lignin for the production of new compounded materials // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. Vol. 55. P. 387–394.
6. Updegraff D. M. Semimicro determination of cellulose in biological materials // Anal. Biochem. 1969. Vol. 32. P. 420–424.
7. Кадималиев Д. А., Ревин В. В., Шутова В. В., Самуилов В. Д. Использование гриба *Panus tigrinus* для производства прессованных материалов из отходов хлопчатника // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40, № 1. С. 57–61.
8. Бузун Г. А., Джемухадзе К. Н., Милешко Л. Д. Определение белка в растениях с помощью амидо-черного // Физиол. растений. 1982. Т. 29, вып. 1. С. 198–204.
9. Синицин А. П., Черноглазов В. П., Гусаков А. В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. М., 1990. Т. 25. С. 25–152.
10. Papinutti V. L., Diorio L. A. Forchiassin F. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran // J. Industrial Microbiology. 2003. Vol. 1. P. 1–8.
11. Даниляк Н. И., Семичаевский В. Д., Дудченко Л. Г., Трутнева И. А. Ферментные системы высших базидиомицетов. Киев, 1989. 278 с.
12. Ахмедова З. Р., Белецкая О. П., Далимова Г. Н., Халикова М. М., Азимходжаева М. Н., Давранов К. Д., Шарипова А. А. Отбор и культивирование целлюлозо- и лигнинразрушающих грибов // Микробиология. 1994. Т. 63, № 5. С. 929–935.
13. Бисько Н. А., Бухало А. С., Вассер С. П. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. Киев, 1983. 312 с.
14. Ревин В. В., Кадималиев Д. А., Атыкян Н. А., Суткин Б. В. Свойства пероксидазы гриба *Panus tigrinus* // Биохимия. 2000. Т. 65, № 11. С. 1305–1309.
15. Шутова В. В., Ревин В. В., Мяскушина Ю. А. Влияние ионов меди на продукцию лакказы грибом *Lentinus (Panus) tigrinus* // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44, № 6. С. 683–687.
16. Дзедзюля Е. И., Беккер Е. Г. Mn-пероксидаза из *Vjerkandera adusta* 90-41 : выделение и субстратная специфичность // Биохимия. 2000. Т. 65, № 6. С. 829–835.