

УДК 576.8.095.3

## Деструкция модельных соединений лигнина пионерными штаммами грибов-колонизаторов древесных отходов

Л. А. БЕЛОВЕЖЕЦ<sup>1</sup>, И. В. ВОЛЧАТОВА<sup>2</sup>, С. А. МЕДВЕДЕВА<sup>2</sup><sup>1</sup>Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского Сибирского отделения РАН,  
ул. Фаворского, 1, Иркутск 664033 (Россия)E-mail: [irina@irioch.irk.ru](mailto:irina@irioch.irk.ru)<sup>2</sup>Иркутский государственный технический университет,  
ул. Лермонтова, 83, Иркутск 664074 (Россия)

(Поступила 09.06.09; после доработки 22.10.09)

### Аннотация

Изучены пути биотрансформации некоторых ароматических соединений штаммами грибов *Trichoderma asperellum* и *Penicillium cyclopium*, выделенных ранее из гидролизного лигнина. Показано, что деструкция этих соединений носит окислительный характер. Биотрансформация ароматических субстратов сопровождается реакциями  $\alpha$ -окисления, деметилирования, олигомеризации, деструкции ароматического кольца. В составе ферментных комплексов грибов обнаружено наличие целлюлазы и Mn-зависимой пероксидазы. Отмечена корреляция динамики активности Mn-зависимой пероксидазы и скорости деструкции ароматических соединений. Для компостирования лигноцеллюлозных отходов отобраны штаммы *Trichoderma asperellum* № 3, 10 и 11, обладающие максимальной Mn-пероксидазной активностью и высокой скоростью утилизации ароматических субстратов.

**Ключевые слова:** ароматические соединения, грибы, Mn-пероксидазная активность

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема загрязнения окружающей природной среды отходами целлюлозно-бумажной и лесохимической промышленности относится к ряду главных проблем современности. Так, одним из крупнотоннажных отходов в России является гидролизный лигнин (ГЛ), в состав которого входят значительно преобразованный лигнин древесины, трудногидролизуемые полисахариды, смолистые вещества, минеральные и органические кислоты. Одним из направлений утилизации ГЛ служит получение органоминеральных удобрений с использованием микроорганизмов и их ферментов. Микробиологический способ утилизации лигнинсодержащих отходов представляет собой наиболее экологически целесообразный процесс, который в естественных условиях протекает медленно, в течение десятилетий.

Занимаясь разработкой биотехнологических процессов получения органоминеральных

удобрений (компостов) на основе ГЛ, мы убедились, что для его утилизации в короткие сроки необходимо использовать микроорганизмы, обладающие ферментами целлюлазного и оксидоредуктазного типов. Осуществлять биодеструкцию лигноцеллюлозных субстратов, особенно труднодоступной их ароматической составляющей, в значительной мере способны лишь грибы. Ранее [1] мы продемонстрировали возможность биоконверсии ГЛ ассоциацией микроорганизмов, способной деградировать как низкомолекулярные компоненты (в том числе и токсичные для растений), так и высокомолекулярные – полисахариды и лигнин.

В ходе изучения деградационной сукцессии, протекающей при компостировании ГЛ, из контрольного бурта нами было выделено 46 изолятов микроорганизмов, наиболее быстро заселивших субстрат [2]. Это культуры грибов-сапротрофов, которые в природных условиях способны колонизировать практически

ки любой органический субстрат и использовать его компоненты в качестве источника питания. К таким микроорганизмам, первыми колонизирующим древесные субстраты, относятся быстрорастущие несовершенные и сумчатые грибы. Обычно они питаются легкодоступными веществами древесного субстрата, однако их считают способными довести процесс деструкции до конца [3], поэтому они могут оказаться перспективными при компостировании.

По способности расти на среде с ГЛ в виде единственного источника углерода, скорости роста и накопления биомассы для дальнейшего исследования отобраны восемь грибных культур, определенных как *Penicillium cyclopium* Westling и *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeld et Nirenberg. Грибы, относящиеся к родам *Penicillium* и *Trichoderma*, широко используются как продуценты целлюлаз и гемцеллюлаз [4]. Некоторые представители рода *Trichoderma* также обладают биоцидной активностью по отношению к фитопатогенным грибам. По данным работы [5], при инкубировании *Trichoderma* sp. наблюдается 100 % ингибирование *Botrytis* sp. и *Rhizoctonia solani*.

Изучение деградации грибами самого лигнина проводить затруднительно, поэтому в экспериментах использовались соединения, моделирующие структурные фрагменты ГЛ. Подобные исследования позволяют лучше понять характер процессов разложения как ГЛ, так и нативных лигнинов древесины. Цель данной работы заключалась в исследовании путей биотрансформации некоторых ароматических соединений, моделирующих основные фрагменты и связи лигнина с различным типом замещения кольца, под действием штаммов грибов *Trichoderma asperellum* и *Penicillium cyclopium* для усовершенствования микробиологической ассоциации в процессах компостирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование грибов *T. asperellum* (штаммы № 3, 4, 7, 8, 10, 11) и *P. cyclopium* (№ 6, 9) осуществляли в колбах Эрленмейера вместимостью 300 мл при 26 °С. В колбы наливали по 100 мл жидкой среды следующего состава, г/л:  $K_2HPO_4$  1.5,  $MgSO_4$  0.21,

$NaCl$  0.1,  $KNO_3$  0.5,  $FeSO_4$  0.001,  $CaCO_3$  0.25, глюкоза 10.0. Засев производили агаризованным блоком мицелия диаметром 0.5 см. В культуральных фильтрах определяли лакказную активность по сиригальдазину [6], лигниназную – по вератровому спирту [7], Мп-пероксидазную – по НАДН [8]. Пероксидазную активность определяли спектрофотометрически ( $\lambda = 490$  нм) по окислению о-данизидина при 20 °С; целлюлазную активность – по фильтровальной бумаге, которую гидролизовали в растворе 0.1 М ацетатного буфера (рН 5.9) при 50 °С. Количество образовавшихся редуцирующих сахаров определяли по методу Шомоди–Нельсона [9]. Количество белка определяли методом Лоури [10] в интервале значений 0.01–0.3 мг/мл. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-26 (Россия). За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль продукта за 1 мин на 1 мг белка.

В качестве модельных соединений использовали ароматические соединения с о-дигидроксид-, гваяцильным, вератрильным и сиригильным типом замещения кольца: ванилин, ванилиновый спирт, протокатеховую кислоту, пирокатехин (“Реахим”, Россия, квалификация “х. ч.”); гваяцилпропанол-1, вератровый спирт, сиреневую кислоту, синтезированные по методикам [11]. Чистоту синтезированных реактивов проверяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Биотрансформацию осуществляли в жидкой питательной среде, добавляя исследуемое соединение в жидкую питательную среду при посеве с концентрацией 0.04–0.08 мг/л. Пробы в количестве 1 мл отбирали с 1-х по 24-е сутки культивирования с интервалом в 2 сут. Состав метаболитов анализировали методом ВЭЖХ на хроматографе Милихром-1 (Россия), который позволяет детектировать вещества в диапазоне концентраций 0.1–0.001 %. Колонку заполняли сорбентом Сепарон  $C_{18}$ , в качестве элюента использовали 40 % раствор метанола в 0.01 М  $KH_2PO_4$ , подкисленном с использованием  $H_3PO_4$  до рН 3.9. Детектирование осуществляли в ультрафиолетовой области при  $\lambda = 280$  нм. Идентификацию метаболитов проводили путем сравнительного анализа их времен удерживания и спектральных отношений  $A_{260}/A_{230}$  с

аналогичными показателями для стандартных образцов, а также методом добавления стандартного образца в исследуемую пробу. Содержание соединений в пробах рассчитывали по площади хроматографических пиков в сравнении с площадями пиков образцов известной концентрации.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Целлюлазная активность отмечается для всех изолятов и характеризуется наличием двух максимумов (на 6–9-е и 14–16-е сутки). Особенно выделяется *P. cyclosporum* № 6, целлюлазная активность которого существенно (в 5–15 раз) превышает активность остальных культур (рис. 1).

Определение оксидоредуктазной активности выявило наличие только Mn-зависимой пероксидазы. По динамике Mn-пероксидазной активности все штаммы можно разделить на две группы. Для первой группы (*T. asperellum*, штаммы № 4, 7, 10, 11; *P. cyclo-*

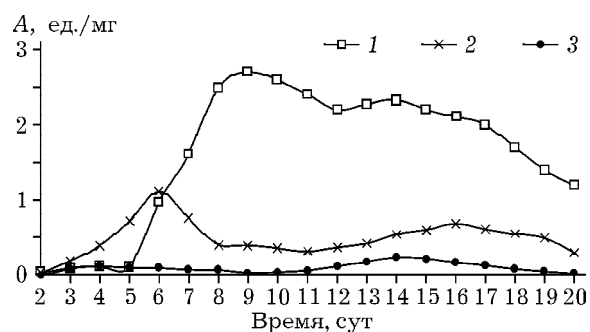


Рис. 1. Изменение целлюлазной активности *Trichoderma asperellum* № 7 (1), *Penicillium cyclosporum* № 6 (2) и *Trichoderma asperellum* № 11 (3) в процессе культивирования.

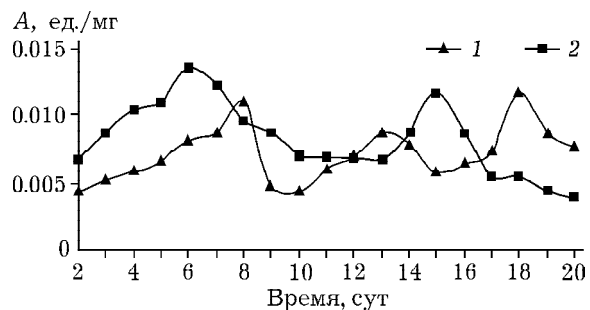


Рис. 2. Динамика Mn-пероксидазной активности штаммов *Trichoderma asperellum* № 3 (1) и № 11 (2).

*rium* № 6, 9) характерны два четких максимума активности: на 5–7-е и 13–15-е сутки культивирования (рис. 2). Первый максимум соответствует началу фазы экспоненциального роста, а второй – фазы споруляции. Для второй группы штаммов (*T. asperellum* № 3, 8) выявлены три максимума активности: на 8-е, 13–14-е и 18-е сутки. Наибольшей суммарной Mn-пероксидазной активностью обладают штаммы *T. asperellum* № 8, 10, 11.

Известно, что Mn-пероксидаза является ключевым ферментом некоторых грибов и играет важную роль в разложении лигнина [12]. Фермент окисляет фенольные единицы лигнина с образованием феноксильных радикалов, которые, в свою очередь, подвергаются разнообразным реакциям, заканчивающимся деполимеризацией [13]. На примере модельных соединений интересно провести оценку возможности выделенных культур разрушать лигнин.

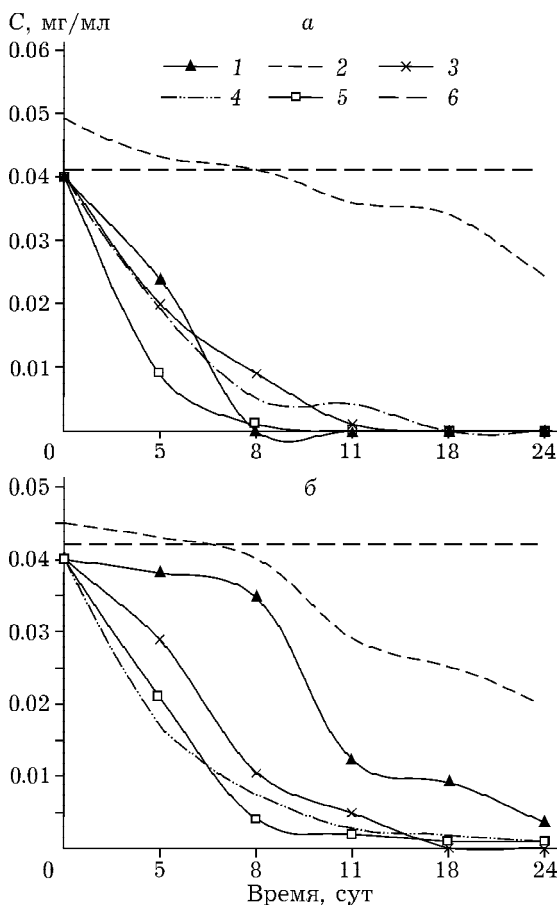


Рис. 3. Содержание в культуральной жидкости *Trichoderma asperellum* № 8 (а) и *Penicillium cyclosporum* № 9 (б) исследуемых субстратов в течение культивирования: 1 – ванилин, 2 – вератровый спирт, 3 – гваяцилпропанол, 4 – ванилиновый спирт, 5 – пирокатехин, 6 – сиреневая кислота.

Все исследованные культуры включали в метаболизм соединения со свободной фенольной гидроксильной группой. Максимальная скорость утилизации субстратов наблюдалась на 3–5-е сутки с полным их исчезновением на 8–24-е сутки в зависимости от штамма. На рис. 3 приведена динамика убыли субстратов для наиболее и наименее активных штаммов. Сиреневая кислота проявляла резистентность к биотрансформации всеми исследованными штаммами. Вератровый спирт – соединение с замещенной фенольной гидроксильной группой – подвергался утилизации со значительно меньшей скоростью.

Убыль ванилина для штаммов *T. asperellum* № 3, 8, 10, 11 сопровождалась появлением двух доминирующих метаболитов. При этом для штаммов № 3, 11 один из них идентифицирован как ванилиновый спирт, а для штаммов № 8, 10 – как протокатеховая кислота. Второй пик хроматографически совпадал для всех четырех культур и по совокупности данных (спектральные характеристики, двухволновая детекция  $\lambda = 230/260$  нм) предположительно определен как димер ванилиновой кислоты (рис. 4). Следовательно, данные изоляты способны к окислению ванилина и последующей димеризации образовавшегося продукта. Несмотря на принадлежность культур к одному виду микроорганизмов, проявляются штаммовые различия: одни культуры (штаммы № 3, 11) осуществляют реакции восстановления (1), другие (штаммы № 8, 10) – деметоксилирования (2) (схема 1).

Оба этих пути характерны для микробного разложения [14].

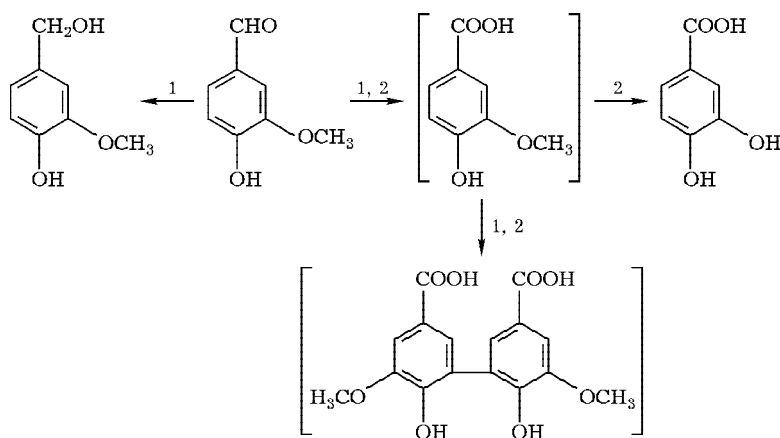


Схема 1.

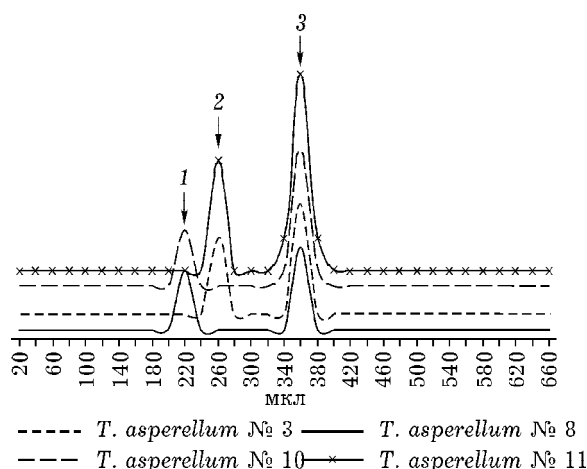


Рис. 4. ВЭЖХ метаболитов ванилина (12 сут культивирования): 1 – протокатеховая кислота, 2 – ванилиновый спирт, 3 – димер ванилиновой кислоты.

Трансформация ванилина грибами *P. cyclospium* (штаммы № 6, 9), *T. asperellum* № 7 сопровождалась образованием большого числа соединений. На основании ранее полученных результатов [15] и данных спектрального анализа сделано предположение, что в культуральной жидкости содержатся продукты олигомеризации. Включение в метаболизм ванилинового спирта для большинства культур также происходило через олигомеризацию.

Различными оказались и пути использования грибами пирокатехина. Так, *P. cyclospium* № 9 и *T. asperellum* № 7 преобразовывали его в единственный метаболит, в УФ-спектре которого наблюдался максимум поглощения при 250 нм (рис. 5); при культивировании штаммов *T. asperellum* № 3, 8, 10, 11 выявлено пять–десять различных продуктов

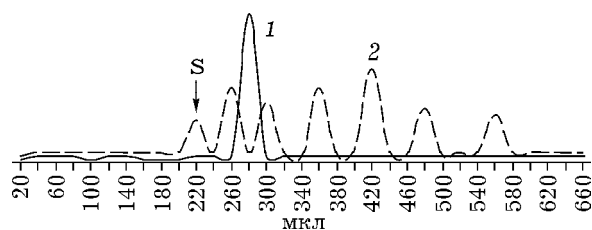


Рис. 5. ВЭЖХ метаболитов пирокатехина (S), инкубированного со штаммами грибов: 1 - *P. cyclopium* № 9 и *T. asperellum* № 7; 2 - *T. asperellum* (№ 3, 8, 10, 11).

ароматической природы. Штаммы *P. cyclopium* № 6 и *T. asperellum* № 4 к 10-м суткам утилизировали пирокатехин, вероятно, до алифатических соединений, так как ароматических метаболитов обнаружить не удалось.

Гваяцилпропанол-1 активно подвергали биотрансформации (исчезновение в течение 6–10 сут) лишь три культуры – *T. asperellum* № 8, *P. cyclopium* № 6, 9, гораздо медленнее (19–20 сут) происходила его утилизация грибами *T. asperellum* (штаммы № 4, 10, 11). При этом в первом случае наблюдалось образование большой серии ароматических метаболитов, а во втором случае утилизация либо сопровождалась образованием единственного соединения (для *T. asperellum* № 11), либо проходила без образования каких-либо ароматических веществ.

Интересные данные получены для вератрового спирта. Установлено, что культуры *T. asperellum* № 4, 7 и *P. cyclopium* № 6 не способны утилизировать данный субстрат. В культуральной жидкости *T. asperellum* № 8 на фоне убывающего количества вератрового спирта (27 % за 8 сут) обнаружены два новых соединения – вератровая и протокатеховая кислоты. Биотрансформация вератрового спирта до протокатеховой кислоты, вероятно, протекает постадийно через образование вератрового альдегида, последующее его окисление до вератровой кислоты и далее сопровождается деметилированием последней (схема 2).

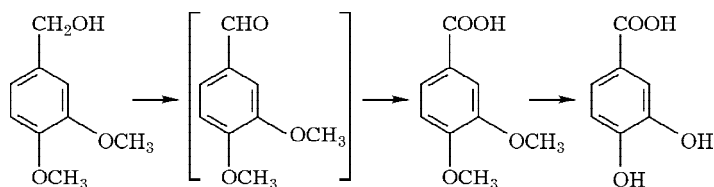


Схема 2.

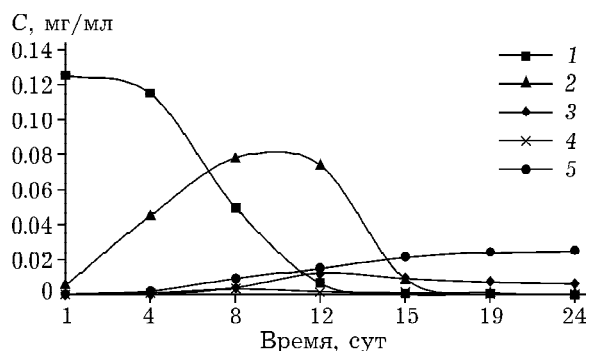


Рис. 6. Содержание в культуральной жидкости *Trichoderma asperellum* № 10 субстрата (1) и метаболитов (2–5): 1 – вератровый спирт; 2 – вератровая кислота; 3 – ванилиновый спирт; 4 – ванилин; 5 – протокатеховая кислота.

*T. asperellum* (штаммы № 3, 10, 11) и *P. cyclopium* № 9 более активно включали в метаболизм вератровый спирт. К 20-м суткам культивирования *T. asperellum* № 3 утилизировал более 90 % субстрата, образуя четыре метаболита, среди которых идентифицирована вератровая кислота, исчезающая к 12-м суткам культивирования. Для *T. asperellum* № 11 на фоне активной деструкции вератрового спирта (60 % за 20 сут) выявлены только два метаболита с преобладанием вератровой кислоты, причем ее количество постепенно возрастало на протяжении всего эксперимента. *T. asperellum* № 10 быстрее остальных деструктировал вератровый спирт (рис. 6). При этом в разные сроки инкубирования в культуральной жидкости обнаружены шесть метаболитов, из которых идентифицированы вератровая и протокатеховая кислоты, ванилиновый спирт и ванилин (см. рис. 6, 7). Таким образом, выявлено два параллельных направления деструкции вератрового спирта штаммом *T. asperellum* № 10: первое протекает аналогично *T. asperellum* № 8 (см. схему 2); второе состоит в преобразовании вератрового спирта в ванилиновый и частичном окислении последнего до ванилина.

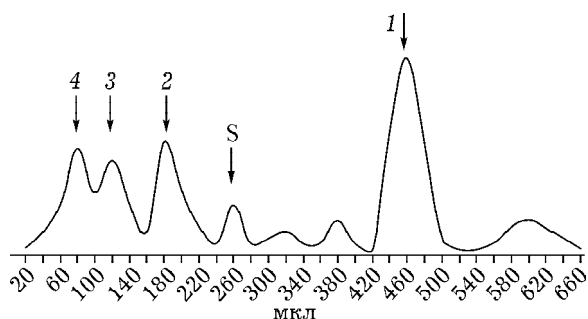


Рис. 7. ВЭЖХ метаболитов вератрового спирта (S), инкубированного с *Trichoderma asperellum* № 10 в течение 12 сут: 1 — вератровая кислота, 2 — ванилин, 3 — ванилиновый спирт, 4 — протокатеховая кислота.

Анализ динамики Mn-пероксидазной активности и убыли субстратов показал, что активная биотрансформация соединений с незамещенной фенольной гидроксильной группой для всех культур совпадает с первым максимумом активности фермента. В случае вератрового спирта для культур первой группы (два максимума активности) активное разрушение субстрата совпадает с максимумами активности фермента, что наиболее четко прослеживалось в случае гриба *P. cyclospium* № 9 (рис. 8). Исключение составляет гриб *T. asperellum* № 11, который активно разрушал вератровый спирт лишь после 13 сут культивирования. Для культур второй группы (три максимума активности Mn-пероксидазы) начало активного разложения вератрового спирта соответствует второму максимуму для *T. asperellum* № 3 и третьему максимуму — для *T. asperellum* № 8.

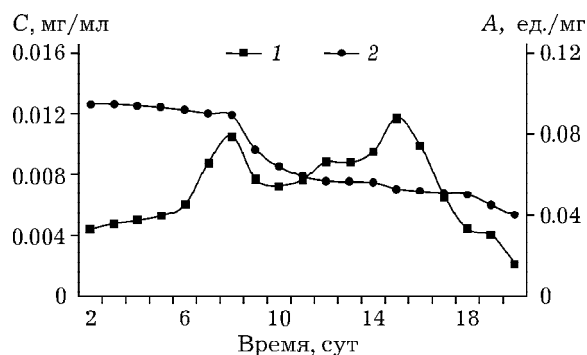


Рис. 8. Изменение активности Mn-зависимой пероксидазы (1) и содержания вератрового спирта (2) в процессе культивирования *Penicillium cyclospium* № 9.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, все исследованные штаммы активно включают в метаболизм структуры со свободной фенольной гидроксильной группой. Основным направлением биodeградации этих веществ является окисление, прежде всего,  $\alpha$ -атома алифатической цепи. Некоторые штаммы способны осуществлять реакции деметилирования, олигомеризации и деструкции ароматического кольца. Этерификация гидроксильной группы затрудняет вовлечение ароматических соединений в метаболизм грибов. Все штаммы *T. asperellum* и *P. cyclospium* проявляют не только целлюлазную, но и Mn-пероксидазную активность. Динамика Mn-пероксидазной активности коррелирует со скоростью биотрансформации ароматических соединений. Из исследованных культур наиболее перспективными для компостирования лигноцеллюлозных отходов можно считать грибы *T. asperellum* (штаммы № 3, 10 и 11), обладающие максимальной Mn-пероксидазной активностью и высокой скоростью утилизации ароматических субстратов.

Авторы выражают глубокую признательность сотруднику Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН А. Н. Петрову за идентификацию микроорганизмов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Волчатова И. В., Медведева С. А., Коржова Л. Ф., Рудых Н. В. // Прикл. биохим. и микробиол. 2000. Т. 36, № 3. С. 293–298.
- 2 Волчатова И. В., Беловежец Л. А., Медведева С. А. // Микробиология. 2002. Т. 71, № 4. С. 545–549.
- 3 Green N. P. O., Stout G. W., Taylor D. J. Biology. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1985. 368 P.
- 4 Рабинович М. Л., Болобова А. В., Кондращенко В. И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. 1. Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. 264 С.
- 5 Obregon-Gomez M. // J. Zhejiang Univ. Agr. Life Sci. 2004. Vol. 30, No. 4. P. 409.
- 6 Kawai S., Umezawa T., Higuchi T. // Arch. Biochem. Biophys. 1988. Vol. 262, No. 1. P. 99–110.
- 7 Tien M., Kirk T.K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. Vol. 81, No. 8. P. 2280–2284.
- 8 Закис Г.Ф. Синтез модельных соединений лигнина. Методики. Рига: Зинатне, 1980. 288 С.
- 9 Asada Y., Miyabe M., Kikkawa M., Kuwakara H. // J. Ferment. Technol. 1987. Vol. 65, No. 4. P. 483–487.
- 10 Nelson N. // J. Biol. Chem. 1944. Vol. 153. P. 375–381.
- 11 Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 1.

- 12 Wariishi H., Valli K., Gold M. H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. Vol. 176, No. 1. P. 269–275.
- 13 Gold M. H., Youngs H. L., Sollewijn Gelpke M. D. // *Metal Ions Biological Systems.* / A. Sigel, H. Sigel (Eds). NY: Marcel Dekker, 2000, P. 559–587.
- 14 Alvarez M. L., Belloch C., Villa M., Uruburu F., Larriba G., Coque J.-J. R. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. Vol. 220. P. 49–55.
- 15 Медведева С. А., Волчатова И. В., Бабкин В. А., Антипова И. А., Каницкая Л. В., Иванова С. З., Ступина Э. С. // *Химия природ. соед.* 1994. № 6. С. 808–819.