

УДК 577.152.9

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛИГНОЛИТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ, ПРИНАДЛЕЖАЩИХ К РАЗЛИЧНЫМ ТАКСОНОМИЧЕСКИМ И ЭКОЛОГИЧЕСКИМ ГРУППАМ

© 2013 г. Т. В. Фёдорова*, Н. В. Шахова**, О. И. Кляйн*, О. А. Глазунова*, Л. Г. Малошенок*,
Н. А. Куликова*,***, Н. В. Псурцева**, О. В. Королёва*

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: fedorova_tv@mail.ru

**Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, 197376

***Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, 119991

Поступила в редакцию 7.06.2013 г.

Проведен скрининг лигнолитической активности грибов-базидиомицетов из Коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (LE-BIN), принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам. Выявлены закономерности расположения таксонов активных продуцентов лигнолитических ферментов в современной системе грибов. В результате проведенного кластерного анализа показано, что в группу грибов, обладающих наибольшим лигнолитическим и деградационным потенциалом, входят представители семейств Pleurotaceae, Polypogonaceae и Phanerochaetaceae, которые осуществляют первые стадии разложения древесины. В результате были отобраны виды, представляющие интерес для дальнейшего исследования их окислительного потенциала и использования в биотехнологии.

DOI: 10.7868/S0555109913060081

В последнее время неуклонно растет интерес к биоконверсии лигноцеллюлозных отходов, что обусловлено увеличением объема отходов целлюлозно-бумажной (ЦБП) и деревообрабатывающей промышленности и, как следствие, увеличением техногенной нагрузки на окружающую среду [1]. Так, по данным Федеральной службы государственной статистики общий объем отходов ЦБП в России увеличился с 2991.2 млн т. в 2005 г. до 4303.3 млн т в 2011 г. В то же время основными методами утилизации данных отходов в нашей стране остается складирование на полигонах и сжигание после обезвоживания и уплотнения.

Использование биотехнологических подходов для конверсии отходов ЦБП ограничено их токсичностью, обусловленной присутствием различных соединений, таких как полиароматические углеводороды ксенобиотики (диоксины, производные хлора и др.) и наличием лигнина — одного из самых труднодеградируемых биополимеров. Именно поэтому базидиальные грибы — наиболее активные деструкторы лигнина привлекают внимание исследователей как основной компонент технологии биоконверсии лигноцеллюлозных отходов. Из всех известных представителей базидиомицоты грибы белой гнили являются наиболее эффективными деструкторами лигнина [2]. Процесс деструкции лигноцеллюлозного субстрата этими грибами состоит из большого количества стадий и зависит от

наличия у них системы ферментов — уникального лигнолитического комплекса, в состав которого входят: лакказы (КФ 1.10.3.2) и различные пероксидазы, в том числе марганец пероксидазы (КФ 1.11.1.13) и лигнин пероксидазы (КФ 1.11.1.14) [3–5]. Известно, что некоторые виды грибов белой гнили — деструкторы древесины обладают уникальными механизмами детоксификации как продуктов деградации лигнина, так и различных ксенобиотиков [6, 7], поэтому исследователями постоянно проводятся работы по поиску, выделению и изучению новых штаммов базидиомицетов, перспективных для использования в технологиях биоконверсии и биоремедиации [8–10].

Настоящая работа является первым этапом разработки биотехнологии переработки твердых отходов ЦБП с использованием базидиомицетов.

Цель работы — скрининг и оценка лигнолитического и деградационного потенциалов грибов белой гнили из различных экологических и таксономических групп, выбор наиболее перспективных штаммов для использования в утилизации лигнинсодержащих отходов ЦБК.

МЕТОДИКА

Скрининг культур. Более 520 культур 330 видов высших грибов базидиомицетов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим

группам, из Коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) были использованы для оценки лигнолитического и деградационного потенциалов экспресс методами [11]. Для дальнейшей работы были отобраны наиболее активные штаммы, представленные в табл. 1. Все культуры хранились в пробирках на скошенном сусло-агаре (плотность сусла 4%; агар 1.5%) при 4°C.

Видовая идентификация. Видовую принадлежность грибов определяли морфологически с использованием традиционных методов с последующим генотипированием.

Штаммы выращивали на среде МЭА с 2% мальтэкстракта (“Диа-М”, Россия) и 1.6% агара (“Difco”, США), на чашках Петри (90 мм) при температуре 25°C в темноте. Рост штаммов характеризовали по диаметру колонии на 7 и 14 сут роста. Характеристику макро- и микроморфологических особенностей мицелия проводили на 4-х недельных колониях по стандартным методикам [12, 13]. Макроморфологическая характеристика включала описание воздушного мицелия, цвета, запаха и реверзума колоний, микроморфологическая — характерных особенностей гифальной системы, наличие на мицелии вздутий, пряжек и анаморф (структур бесполого размножения). Стадию телеоморфы (плодообразование) в культуре получали на субстратных блоках (березовые опилки с пшеничными отрубями 3 : 1) в климатической камере Sanyo MLR-351H при температуре 15°C и влажности 85%.

Для генотипирования исследуемых грибных штаммов было проведено частичное 18S, 28S и полное 5.8S определение нуклеотидных последовательностей рРНК, а также последовательности ДНК, находящейся между генами, кодирующими 18S, 5.8S и 28S рРНК (ITS1 и ITS2 регионы) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров на консервативные участки генов рибосом ITS1F 5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3' и ITS4B 5'-CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG-3' [14]. ПЦР проводили в следующих условиях: 1 цикл 5 мин 95°C, далее 25 циклов (1 мин 90°C, 1 мин 56°C, 1 мин 72°C) и 1 цикл 10 мин 72°C.

Экспресс-метод оценки общей лигнолитической и лакказной активностей. Для качественной оценки лигнолитической и лакказной активностей экспресс-методом [11] штаммы выращивали в темноте при 25°C на чашках Петри (90 мм) на средах следующего состава: среда С-А, % — пивное сусло — 4.0, агар — 2.0; среда Г-П, г/л: KH_2PO_4 — 0.6; K_2HPO_4 — 0.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; CaCl_2 — 0.05; MnSO_4 — 0.05; ZnSO_4 — 0.001; FeSO_4 — 0.0005; пептон — 3.0; глюкоза — 10.0; агар — 2.0%; среда Г-П + Cu, г/л: состав тот же, что и у среды Г-П с добавлением 0.15 г/л CuSO_4 .

При посеве блоки 7-суточного мицелия гриба, выращенного на среде МЭА, диаметром 5 мм помещали с краю чашки мицелиальным слоем вниз. Активность лигнолитических ферментов определяли через 1 и 2 нед роста. Около растущего края колонии вырезали мицелиальные блоки диаметром 5 мм, переносили в лунки микробиологических планшетов и по каплям наносили растворы гваякола (“Sigma”, США) 2 мл/100 мл H_2O и 1.0%-ного синингалдазина (“Sigma”, США) в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Активность оценивали визуально по интенсивности цветовой реакции: от “—” — нет активности до “+++” — высокая активность, через 5, 15, 30, 60 мин и 3, 24 ч.

Экспресс-метод оценки лигнинпероксидазной активности. Качественную оценку лигнинпероксидазной активности проводили диффузионным экспресс методом [15]. Штаммы выращивали в темноте при 25°C на чашках Петри (90 мм) на средах С-А, Г-П, Г-П + Cu с добавлением в них в стерильных условиях перед розливом 0.02%-ного раствора азура Б. При посеве блоки 7-суточного мицелия на среде МЭА диаметром 5 мм помещали с краю чашки мицелиальным слоем вниз. Активность лигнинпероксидазы определяли через 1 и 2 нед роста. Активность оценивали визуально по интенсивности изменения окраски красителя в диапазоне “—” — нет активности до “+++” — высокая активность.

Методы культивирования. Инокулят грибов выращивали стационарно в 750 мл конических колбах с фарфоровыми бусами на среде Г-П без добавления агара при 25°C 10–14 сут в зависимости от скорости роста гриба. Перед засевом инокулят измельчали фарфоровыми бусами 20 мин при 180 об/мин до образования однородной суспензии, которую в объеме 10% стерильно вносили в колбы для культивирования.

Глубинное культивирование проводили на качалке при 180 об/мин в течение 20 сут в 750 мл конических колбах на средах С-А, Г-П и Г-П + Cu без агара. Отбор проб культуральной жидкости для измерения лакказной активности проводили ежедневно.

Определение лакказной активности. Активность лакказы регистрировали спектрофотометрически по увеличению оптической плотности после добавления 0.1 мл 0.018%-ного спиртового раствора синингалдазина в реакционную смесь (1.7 мл фосфатно-цитратного буфера, pH 5.0 и 0.2 мл культурального фильтрата при длине волны $\lambda = 525$ нм [16]. За условную единицу ферментативной активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной среды за 1 мин.

Выделение ДНК. Для выделения грибной хромосомной ДНК использовали мицелий на 8–10 сут поверхностного культивирования. Мицелий промывали дистиллированной водой, после чего

Таблица 1. Характеристика исследуемых штаммов грибов

Штамм	Видовая принадлежность	Таксономическая принадлежность	Географическое происхождение	Экология вида
LE-BIN 1998	<i>Antrodiella faginea</i> Vampola & Pouzar	Steccherinaceae, Polyporales	Россия, Дальний Восток. Субстрат — сухие ветви лиственных деревьев.	Вторичный ксилотроф (характерный для сильно разложившейся древесины или сохраняющийся на ней до 15 и более лет), вызывает белую гниль. Заселяет валежные веточки, крупные ветви и стволы лиственных деревьев, реже кустарников, из родов <i>Fagus</i> , <i>Quercus</i> , <i>Acer</i> , <i>Betula</i> , <i>Alnus</i> , <i>Populus</i> , <i>Salix</i> , <i>Padus</i> , <i>Corylus</i> , <i>Syringa</i> .
LE-BIN 0677	<i>Corioloopsis caperata</i> (Berk.) Murrill	Polyporaceae, Polyporales	Куба	Ксилотроф, вызывает белую гниль. Обитает на разрушенной древесине покрытосеменных в сомкнутых лесных сообществах и мангровых зарослях тропической зоны.
LE-BIN 2047	<i>Lenzites betulina</i> (L.) Fr.	Polyporaceae, Polyporales	Финляндия, р-н Лахти. Субстрат — ствол березы <i>Betula</i> sp. в хвойном лесу.	Раневый первичный ксилотроф, (осуществляющий первые стадии разложения древесины приблизительно до 7 лет) вызывает белую гниль. Обитает на древесине лиственных деревьев, чаще всего на видах из родов <i>Betula</i> , а также <i>Acer</i> , <i>Alnus</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Corylus</i> , <i>Fagus</i> , <i>Fraxinus</i> , <i>Juglans</i> , <i>Prunus</i> , <i>Quercus</i> , <i>Salix</i> , <i>Sorbus</i> , <i>Tilia</i> , <i>Ulmus</i> .
LE-BIN 2009	<i>Byssomerulius avellaneus</i> (Bres.) J. Erikss. & Hjortstam	Phanerochaetaceae, Polyporales	Россия, Дальний Восток. Субстрат — сухостойные ветви в дубовой роще.	Ксилотроф, вызывает белую гниль. Обитает на сухостойных и валежных ветвях, а также детрите широколиственных деревьев из родов <i>Acer</i> , <i>Alnus</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Quercus</i> .
LE-BIN 0432	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	Pleurotaceae, Agaricales	Россия, г. Сочи.	Раневый первичный ксилотроф (осуществляющий первые стадии разложения древесины приблизительно до 7 лет), вызывает желтую смешанную гниль. Заселяет ослабленные и усыхающие деревья, а также валежные ветви и пни многих лиственных, иногда — хвойных (<i>Picea</i> , <i>Araucaria</i>) пород деревьев.
LE-BIN 2142	<i>Peniophora lycii</i> (Pers.) Höhn. & Litsch.	Peniophoraceae, Russulales	Россия, Ростовская область. Субстрат — меловые отложения в степи.	Ксилотроф. Обитает на валежных ветвях различных лиственных (<i>Acer</i> , <i>Fagus</i> , <i>Rhamnus</i> , <i>Fraxinus</i>) и изредка — хвойных (<i>Pinus</i>) деревьев.
LE-BIN 1963	<i>Steccherinum murashkinskyi</i> (Burt) Maas Geest.	Steccherinaceae, Polyporales	Россия, Дальний Восток, Камчатский регион. Дерево произрастания — ствол обгоревшей березы <i>Betula platyphylla</i> .	Вторичный ксилотроф (характерный для сильно разложившейся древесины или сохраняющийся на ней до 15 и более лет), вызывает белую гниль. Обитает на валежных стволах и ветвях различных лиственных (<i>Acer</i> , <i>Betula</i> , <i>Populus</i> , <i>Salix</i> , <i>Quercus</i>) и изредка — хвойных (<i>Abies</i>) деревьев.
LE-BIN 1911	<i>Trametes gibbosa</i> (Pers.) Fr.	Polyporaceae, Polyporales	Россия, Самарская обл., Ставропольский район. Дерево произрастания — липа.	Ксилотроф, вызывает активно развивающуюся белую гниль. Обитает на отмершей, преимущественно крупномерной древесине (сухостой, пни, валеж, обработанная древесина) лиственных (чаще всего на <i>Betula</i> , реже — на <i>Alnus</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Cerasus</i> , <i>Fagus</i> , <i>Populus</i> , <i>Salix</i> , <i>Tilia</i> и мн. др.), изредка — хвойных (<i>Abies</i> , <i>Picea</i>) пород деревьев. Высоко конкурентный вид, способен медленно вытеснять многие виды дереворазрушающих грибов на большинстве субстратов.
LE-BIN 1795	<i>Xerula radicata</i> (Relhan) Dörfelt	Marasmiaceae, Agaricales	Россия, Самарская обл., Ставропольский район. В основании сильно разрушенного пня.	Ксилотроф. Развивается на корнях (возможно, и на погребенной древесине) преимущественно широколиственных деревьев (<i>Quercus</i> , <i>Fagus</i>). Плодовые тела обычно встречаются в основании старых, сильно разрушенных пней, что позволяет отнести этот вид к вторичным ксилотрофам.

просушивали между слоями фильтровальной бумаги. Высушенный мицелий растирали в ступке с жидким азотом до получения однородного белого порошка. Выделение ДНК из измельченной грибной биомассы проводили согласно протоколам для выделения ДНК “DNeasy Plant Mini Kit (50)” (“Qiagen”, США). Чистоту полученных образцов контролировали методом электрофореза в агарозном геле. Полученные образцы хромосомной ДНК хранили при температуре -20°C .

Выделение суммарной РНК. Выделение суммарной РНК из полученной измельченной грибной биомассы проводили с использованием набора реактивов “RNeasy Plant Mini Kit (50)” (“Qiagen”, США), согласно методике, предложенной производителем, адаптированной для растительного материала и мицелиальных грибов. Суммарная РНК использовалась в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК в реакции обратной транскрипции.

Обратная транскрипция. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием набора реактивов для синтеза кДНК Mint (“Евроген”, Россия), согласно инструкции производителя. Первую цепь кДНК амплифицировали в реакции ПЦР для получения двухцепочечной кДНК (дц-кДНК), обогащенной полноразмерными последовательностями. Полученную дц-кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР.

Проведение ПЦР. Хромосомную ДНК и дц-кДНК каждого исследуемого гриба использовали в качестве матрицы в реакционной смеси для проведения ПЦР. Для ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 2 мкл 10 X Encyclo буфер (“Евроген”, Россия), 0.4 мкл 50 X смесь dNTP (по 20 mM каждого) (“Евроген”, Россия), по 1.0 мкл прямого и обратного праймеров (0.5 мкМ), 0.4 мкл 50 X Encyclo полимеразы (“Евроген”, Россия), 1 мкл ДНК-матрицы, 14.2 мкл стерильной воды. Реакцию проводили в амплификаторе C1000 (“Bio Rad”, США). Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1.2%-ном агарозном геле. Результат визуализировали на УФ-транслюминаторе при длине волны 260 нм.

Идентификация гена лакказы. Для определения наличия гена лакказы использовали следующую программу ПЦР: 1 цикл — 5 мин 94°C , далее 35 циклов (15 с 90°C , 20 с 56°C , 30 с 72°C) и 1 цикл 10 мин 72°C . ПЦР-фрагменты амплифицировали с использованием вырожденных праймеров:

LacA1 For 5'-CAYTGGCAYGGWTTTTCAR-3'

LacA1 Rev 5'-RTGRAARTCDATRTGRCARTG-3'

LacA2 For 5'-GGNACNTTCTGGTAYCAYAGYCA-3'

LacA2 Rev5'-RTANCGNAGDATAGCVGAGTT-3'.

Очистка и клонирование ПЦР-фрагментов. Продукты ПЦР очищали с применением набора

реактивов “QIAquick Gel Extraction Kit (50)” (“Qiagen”, США), согласно методике, предложенной производителем. Клонирование выделенных ПЦР-фрагментов проводили с использованием вектора для быстрого клонирования продуктов ПЦР “pAL-TA” (“Евроген”, Россия) в компетентных клетках *Escherichia coli* XL1-Blue.

Определение нуклеотидных последовательностей. Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов ДНК определяли с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems (США) в Центре коллективного пользования “Геном” ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН.

Анализ последовательностей. Поиск гомологий в GenBank проводили с помощью сервера BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) [17]. Редактирование аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы “BioEdit Sequence Alignment Editor” (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Для выравнивания аминокислотных последовательностей белков применяли программу ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>).

Статистическая обработка. Все эксперименты проводили в трех биологических и аналитических повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы STATISTICA 8.0. Для объединения исследованных штаммов грибов в группы, полученные экспериментальные данные были подвергнуты древовидной кластеризации. Для этого проводили предварительный перевод результатов скрининга в баллы. При формировании кластеров в качестве расстояния между объектами использовали Евклидово расстояние; при объединении кластеров руководствовались методом ближайшего соседа (одиночная связь).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг и определение видовой принадлежности культур. У исследуемых штаммов были изучены культурально-морфологические характеристики для верификации их таксономической принадлежности (табл. 1). Установлено, что культуральные признаки исследованных штаммов *Antrodiaella faginea* 1998, *Coriopsis caperata* 0677, *Lenzites betulina* 2047, *Pleurotus ostreatus* 0432, *Peniophora lycii* 2142, *Trametes gibbosa* 1911 и *Xerula radicata* 1795 были типичны для этих видов [12, 18]. Морфология вегетативного мицелия штаммов *Byssomerulius avellaneus* 2009 и *Steccherinum murashkinskyi* 1963 (рис. 1а, б) была изучена впервые и позволила провести их идентификацию, которая была подтверждена на полученных в культуре базидиомах (рис. 1в). Для подтверждения правильности идентификации

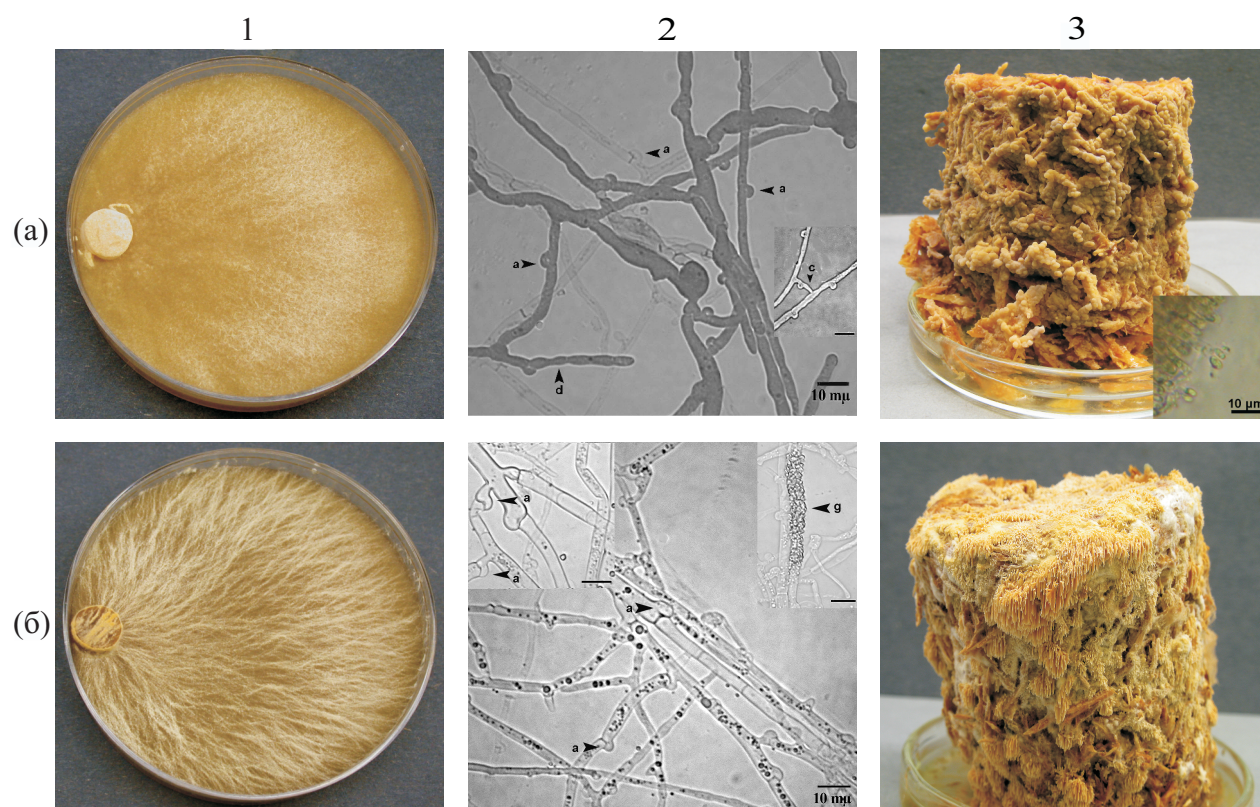


Рис.1. Грибы белой гнили *Byssomerulius avellaneus* 2009 (а) и *Steccherinum murashkinskyi* 1963 (б)
 1 – поверхностный рост грибов на среде С-А; 2 – мицелий грибов х1000; 3 – стадия образования
 плодового тела при выращивании на блоках из опилок. Стрелками и латинскими буквами обозначены:
 а – пряжки, с – ветвление гифов, d – глеоцистида, g – инкрустация гифы.

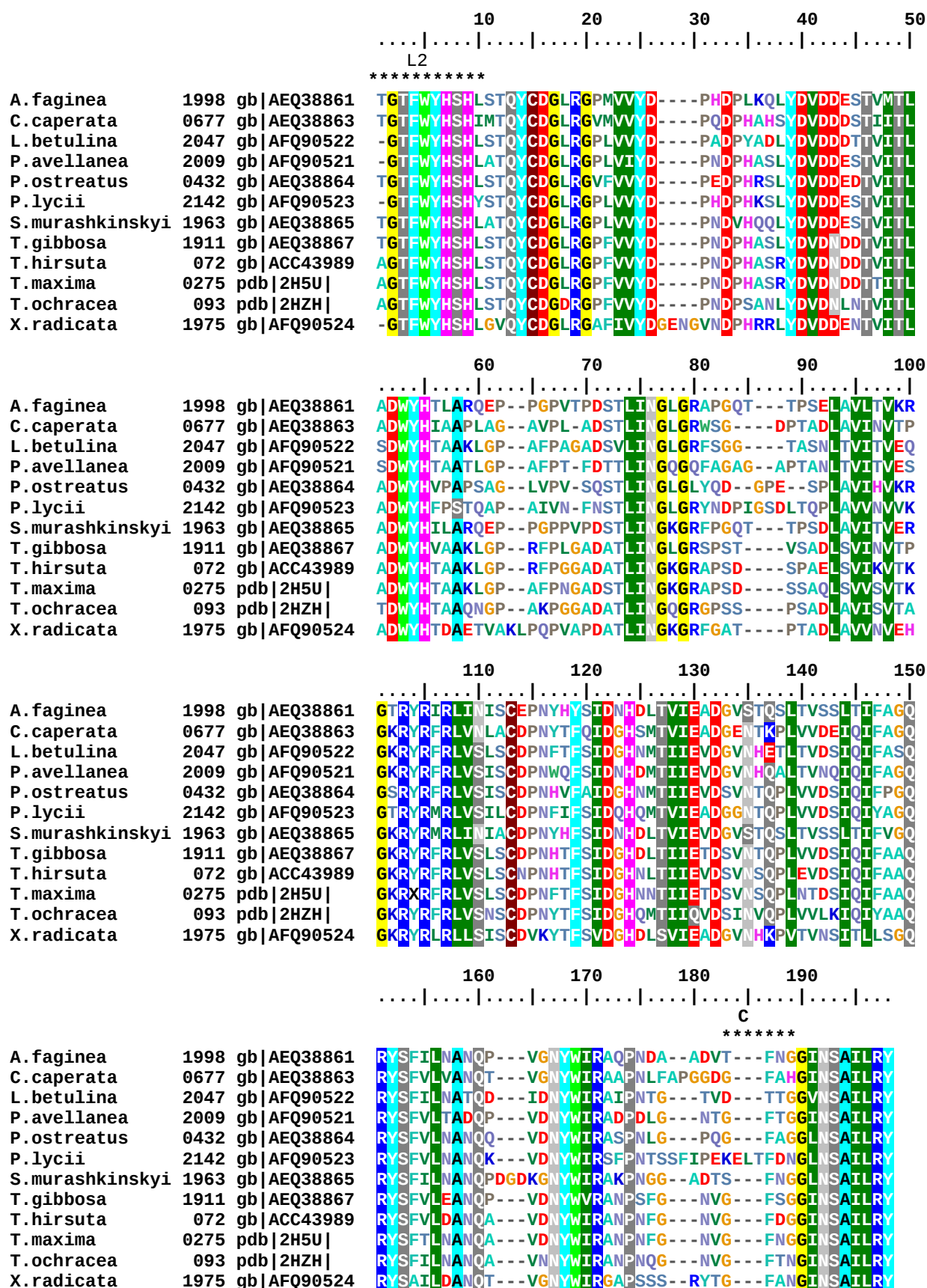


Рис. 4. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей полученных с кДНК исследуемых грибов частичных сиквенсов лакказ (номера в банке данных NCBI: AEQ38861, AEQ38863, AFQ90522, AFQ90521, AEQ38864, AFQ90523, AEQ38865, AEQ38867, AFQ90524) с аминокислотными последовательностями лакказ контрольных штаммов. Звездочками отмечены консервативные участки.

Таблица 2. Верификация видовой принадлежности грибных штаммов методом ДНК-типирования

Штамм	Наиболее близкий штамм из базы данных NCBI (Taxonomy ID)	Идентичность, %
<i>Antrodiella faginea</i> 1998	<i>Antrodiella faginea</i> (92699)	99
<i>Coriolopsis caperata</i> 0677	<i>Coriolopsis caperata</i> (195176)	100
<i>Lenzites betulina</i> 2047	<i>Lenzites betulinus</i> (5632)	99
<i>Byssomerulius avellaneus</i> 2009	<i>Phanerochaete avellanea</i> , синоним <i>Byssomerulius avellaneus</i> , (194676) GU062467	100
<i>Pleurotus ostreatus</i> 0432	<i>Pleurotus</i> sp. 'Florida' (188765)	99
<i>Peniophora lycii</i> 2142	<i>Peniophora lycii</i> (154539)	100
<i>Steccherinum murashkinskyi</i> 1963	<i>Steccherinum murashkinskyi</i> (627145) FJ798705	100
<i>Trametes gibbosa</i> 1911	<i>Trametes gibbosa</i> (160864)	100
<i>Xerula radicata</i> 1795	<i>Hymenopellis radicata</i> , синоним <i>Xerula radicata</i> (937743)	100

штаммов было проведено частичное 18S, 28S и полное 5.8S определение нуклеотидных последовательностей их рРНК, а также последовательностей ITS1 и ITS2 регионов (табл. 2). Видовая принадлежность штаммов 1998, 0677, 2047, 0432, 2142, 1911 и 1795, определенная по морфологическим признакам, совпадала с результатами ДНК типирования (уровень гомологии 100%). В случае штаммов 1963 (*Steccherinum murashkinskyi*) и 2009 (*Byssomerulius avellaneus*) полученная последовательность полностью не совпадала ни с одной из имеющихся в базе данных. Нуклеотидная последовательность базидиомицета *Byssomerulius avellaneus* 2009 имела 98% гомологии с таковой *Phlebia chrysocreas* (номер gi: 37622321), расхождения наблюдались как в области переменных ITS1 и ITS2 регионов, так и в области 28S рибосомы. В случае *Steccherinum murashkinskyi* 1963 наиболее гомологичные последовательности (идентичность 95% и 94% соответственно) обнаружены для *Steccherinum ochraceum* (номер gi: 157057321) и *Steccherinum litschaueri* (номер gi: 56181683), что позволило отнести исследуемый штамм к семейству *Steccherinaceae* sp. (Taxonomy ID: 81060). Последовательности 18S рРНК, 5.8S рРНК и 28S рРНК грибов *Phanerochaete avellanea* (синоним *Byssomerulius avellaneus*) и *Steccherinum murashkinskyi* внесены в NCBI под номерами GU062467 и FJ798705 соответственно.

Таким образом, в группе исследуемых штаммов оказались представители афиллофороидных ксилотрофных грибов из семейств *Phanerochaetaceae* (*P. avellanea*), *Steccherinaceae* (*A. faginea* и *S. murashkinskyi*), *Polyporaceae* (*C. caperata*, *L. betulina* и *T. gibbosa*), принадлежащих к порядку *Polyporales*, и агарикоидных из семейств *Marasmiaceae* (*Xerula radicata*) и *Pleurotaceae* (*P. ostreatus*), принадлежащих к порядку *Agaricales* и кортициоидных грибов из семейства *Peniophoraceae* (*P. lycii*), принадлежащего к порядку *Russulales*.

Для выбора наиболее перспективных штаммов в работе использовали традиционную технику проведения скрининга по лигнолитической активности. В качестве модельных субстратов для определения общей лигнолитической, лакказной и лигнин-пероксидазной активностей использовали гваякол [19], синингалдазин [20] и азур Б [15] соответственно. Обесцвечивание полифенольных красителей, к которым относится также азур Б, базидиомицетами может свидетельствовать также о наличии пероксидаз и H₂O₂-продуцирующих оксидаз [8]. Как было показано ранее, способность некоторых представителей афиллофороидных ксилотрофных грибов к обесцвечиванию полимерных красителей коррелирует с их способностью к деградации различных ксенобиотиков, что позволяет использовать тест по обесцвечиванию азура Б для поиска грибов с высоким детоксификационным потенциалом [8].

Результаты качественной оценки показали, что на всех средах исследуемые штаммы проявляли высокую лигнолитическую и лакказную активности уже через 1–2 нед роста (табл. 3). Состав питательной среды существенно влиял как на рост исследуемых грибов, так и на продукцию ими внеклеточных лигнолитических ферментов. Натуральное пивное сусло (среда С-А), использованное в эксперименте, является богатой органической средой и наилучшим образом подходит для культивирования базидиомицетов, к тому же содержит целый комплекс природных органических соединений, которые могут быть индукторами лигнолитических ферментов. Полусинтетическая среда Г-П, содержащая глюкозу в качестве источника углерода, и пептон как источник азота, с одной стороны, не содержит природных индукторов, а, с другой стороны, при росте на средах с глюкозой грибы белой гнили способны синтезировать глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4), которая является основным источником образования H₂O₂ у некоторых базидиомицетов в процессе роста на

Таблица 3. Активность лигнолитических ферментов исследуемых и контрольных штаммов грибов, определенная экспресс методом

Штамм	Среда	Время выращивания, сут	Рост, мм	Активность		
				гваякол	сириггалдазин	азур Б
LE-BIN 1998	С-А	7	33.3 ± 1.1	+	++	—
		14	78.7 ± 0.9	++	++	+
	Г-П	7	36.3 ± 1.1	±	+	—
		14	89.3 ± 0.9	±	±	±
	Г-П + Cu	7	23.3 ± 4.4	±	++	—
		14	77.3 ± 1.8	+	+	—
LE-BIN 0677	С-А	7	71.0 ± 2.7	+++	+++	—
		14	>90.0	++	++	+
	Г-П	7	37.0 ± 2.0	++	++	—
		14	75.3 ± 1.8	+	+	—
	Г-П + Cu	7	46.3 ± 2.9	+++	+++	—
		14	70.6 ± 1.8	++	++	—
LE-BIN 2047	С-А	7	78.7 ± 0.9	++	++	+
		14	>90.0	+++	+++	+++
	Г-П	7	73.7 ± 2.2	±	±	—
		14	>90.0	±	±	±
	Г-П + Cu	7	56.7 ± 3.1	+	++	—
		14	>90.0	+	++	—
LE-BIN 2009	С-А	7	56.3 ± 2.4	+	++	—
		14	88.3 ± 2.2	++	++	±
	Г-П	7	26.7 ± 2.4	++	++	—
		14	69.3 ± 3.8	±	±	—
	Г-П + Cu	7	37.3 ± 0.9	±	±	—
		14	78.7 ± 0.9	+	—	—
LE-BIN 0432	С-А	7	75.0 ± 1.3	++	+++	±
		14	>90.0	++	++	+++
	Г-П	7	42.3 ± 1.1	±	±	—
		14	63.0 ± 2.0	±	±	—
	Г-П + Cu	7	60.7 ± 1.8	+	+	—
		14	>90.0	±	+	±
LE-BIN 2142	С-А	7	25.0 ± 0.1	++	+	—
		14	64.3 ± 3.8	+	+	±
	Г-П	7	51.0 ± 0.3	±	±	—
		14	87.3 ± 0.4	±	±	—
	Г-П + Cu	7	40.3 ± 1.8	+	++	—
		14	80.0 ± 0.1	++	+	—
LE-BIN 1963	С-А	7	34.7 ± 1.8	++	++	—
		14	68.3 ± 4.4	+++	+++	±
	Г-П	7	23.7 ± 1.1	++	+++	—
		14	47.0 ± 1.3	++	++	—
	Г-П + Cu	7	17.7 ± 0.4	+++	+++	—
		14	34.7 ± 0.4	+++	+++	—
LE-BIN 1911	С-А	7	73.0 ± 1.3	++	++	—
		14	>90.0	+++	++	+++
	Г-П	7	34.7 ± 0.4	++	+++	±
		14	72.0 ± 2.0	±	+	+
	Г-П + Cu	7	35.0 ± 2.0	+++	+++	—
		14	81.7 ± 2.4	++	+++	±

Таблица 3. Окончание

Штамм	Среда	Время выращи- вания, сут	Рост, мм	Активность		
				гваякол	сирингалдазин	азур Б
LE-BIN 1795	С-А	7	43.0 ± 0.5	±	—	—
		14	>90.0	+++	+++	—
	Г-П	7	45.0 ± 1.34	+	+	—
		14	87.3 ± 1.8	++	+	±
	Г-П + Cu	7	40.3 ± 1.8	+	++	—
		14	81.7 ± 2.4	+++	++	—
<i>Trametes hirsuta</i> 072*	С-А	7	>90.0	++	+++	—
		14		++	+++	++
	Г-П	7	65.7 ± 0.9	+++	+++	—
		14	>90.0	++	++	±
	Г-П + Cu	7	78.3 ± 1.0	+++	+++	—
		14	>90.0	+++	++	—
<i>T. maxima</i> 0275*	С-А	7	78.0 ± 1.3	+++	+++	+
		14	>90.0	+	+	+++
	Г-П	7	55.3 ± 3.1	+	++	—
		14	84.3 ± 0.9	±	±	±
	Г-П + Cu	7	65.5 ± 2.56	++	++	—
		14	85.5 ± 1.5	++	++	—
<i>T. ochracea</i> 093*	С-А	7	67.0 ± 2.7	++	++	—
		14	>90.0	++	++	+++
	Г-П	7	50.7 ± 0.9	±	±	—
		14	84.3 ± 1.6	±	±	—
	Г-П + Cu	7	54.7 ± 2.9	+	+	—
		14	84.7 ± 1.6	+++	+++	—

* Обозначены контрольные штаммы.

древесных субстратах [21]. Для стимуляции биосинтеза лигнолитического фермента лакказы в среду Г-П добавляли CuSO_4 (среда Г-П + Cu). Среда С-А оказалась более предпочтительной для штаммов *A. faginea* 1998, *L. betulina* 2047, *P. avellanea* 2009, *P. ostreatus* 0432 и *X. radicata* 1795. На среде Г-П рост грибов *C. caperata*, *P. avellanea*, *P. ostreatus*, *S. murashkinskyi* и *T. gibbosa* замедлялся — чашки Петри полностью покрывались мицелием на 1 нед позже по сравнению с ростом на сусле — цветовая реакция субстратов была менее интенсивной. Наоборот, штаммы *A. faginea* и *P. lycii* на среде Г-П росли быстрее, нежели на среде С-А, однако окисление гваякола и сирингалдазина при этом было менее интенсивным. Добавление меди в качестве индуктора (среда Г-П+Cu) увеличивало продукцию лигнолитических ферментов, в том числе лакказы у *C. caperata*, *L. betulina*, *P. lycii* и *T. gibbosa*, но не оказывало влияния на продукцию лигнолитических ферментов у грибов *A. faginea*, *P. avellanea* и *P. ostreatus*. Реакции с гваяколом и сирингалдазином при выращивании на среде С-А грибов *C. caperata* 0677, *L. betulina* 2047, *P. ostreatus* 0432 и *T. gibbosa* 1911, а также трех контрольных штаммов коррелировали с обесцвечиванием красителя азур Б. При этом полное обесцвечивание красителя было отмечено только для грибов *L. betulina*, *P. ostreatus* и *T. gibbosa*, а также 2 контрольных штаммов *T. maxima* 0275 и *T. ochra-*

cea 093. При росте грибов белой гнили на натуральных субстратах, к которым относится сусло, синтезируются как лигнинпероксидазы, так и различные оксидазы, способные генерировать пероксид водорода, необходимый для проявления каталитической активности пероксидаз [22]. Наличие генов, кодирующих данные ферменты, показано у *Phanerochaete chrysosporium*, *Peniophora gigantea*, *Trametes ochracea* [22, 23], *Trametes versicolor* [21], различных видов *Pleurotus* sp. [24].

Глубинное культивирование и определение наличия гена лакказы в геноме исследуемых грибов. Продукция лакказ в процессе глубинного культивирования была отмечена у всех исследованных штаммов, кроме *P. avellanea* 2009 и *X. radicata* 1795. Показано, что состав среды существенно влиял на величину лакказной активности (рис. 2). Так, для ряда штаммов оптимальной для биосинтеза лакказ была среда С-А: наиболее высокая активность наблюдалась у штаммов *A. faginea* 1998 и *S. murashkinskyi* 1963. Значительная индукция активности фермента солями двухвалентной меди была отмечена при культивировании *C. caperata* 0677, *L. betulina* 2047 и *T. gibbosa* 1911, которые относятся к грибам белой гнили семейства Polyporaceae — активным продуцентам лакказ [25]. Однако для *T. gibbosa* 1911 значения ферментативной активности при культивировании на средах С-А и Г-П + Cu разли-

чались несущественно (3.8 и 2.3 ед./мл, соответственно).

Поскольку все исследованные штаммы, согласно данным быстрого скрининга, окисляли синингалдазин, а в процессе глубинного культивирования штаммов *P. avellanea* 2009 и *X. radicata* 1795 ни на одной из трех сред лакказная активность не детектировалась, было проведено определение наличия генов лакказ в геномах изучаемых грибов.

Известно, что аминокислотные последовательности всех описанных на сегодняшний день лакказ имеют 4 консервативных участка [26]: 61-TSINWHXFQ-69, 106-FWYNSHLSTQY-116, 394-RHPFHLHGH-402 и 449-WFLHCHIDXHL-459 (использована нумерация для аминокислотной последовательности лакказы *Trametes hirsuta*, PDB code 3fpx), где символом X обозначены переменные аминокислотные остатки, входящие в состав консервативного участка. Остатки гистидинов, входящие в состав этих участков, отвечают за координацию ионов меди медного центра T1 и медного кластера T2/T3. В работе [27] описаны праймеры для определения генов лакказ, разработанные для первых двух участков (номера аминокислотных остатков 61–70 и 106–116), с помощью которых можно получить нуклеотидные фрагменты около 200 п.н. Однако, как показано в работе [27], данные праймеры не во всех случаях могут быть использованы. Так в геноме *P. avellanea* и *X. radicata* с помощью данных праймеров генов лакказ обнаружено не было, поэтому были сконструированы новые праймеры. Прямой праймер LacA2 For был подобран на второй консервативный участок последовательностей лакказ (106-FWYNSHLSTQY-116), а для дизайна обратного праймера LacA2 Rev было проведено выравнивание более 100 базидиальных лакказ из банка данных NCBI, в результате чего была определена консервативная последовательность 297-NSAILRY-303. Апробацию ПЦР провели на контрольных штаммах базидиальных грибов, из культуральных жидкостей которых выделены и охарактеризованы классические “голубые” лакказы: *Trametes maxima* 0275 (синоним *Cerrena maxima*), *Trametes ochracea* 093 (синоним *Coriolus zonatus*), *Trametes hirsuta* 072, а также определены полные нуклеотидные последовательности генов лакказ данных базидиомицетов [28]. При использовании пары праймеров LacA2 For – LacA2 Rev ПЦР-продукты амплифицировались во всех исследуемых и контрольных геномах грибов, их размер составлял 750 п.н. (рис. 3а). Специфичность амплификации проверяли секвенированием ПЦР продуктов. Поскольку наличие ПЦР фрагмента с соответствующей лакказе нуклеотидной последовательностью не может гарантировать, что данная последовательность не была амплифицирована с псевдогена, был проведен анализ транскриптома на наличие транскрибируемых генов лакказ методом обратной транскрипции с использованием праймеров LacA2

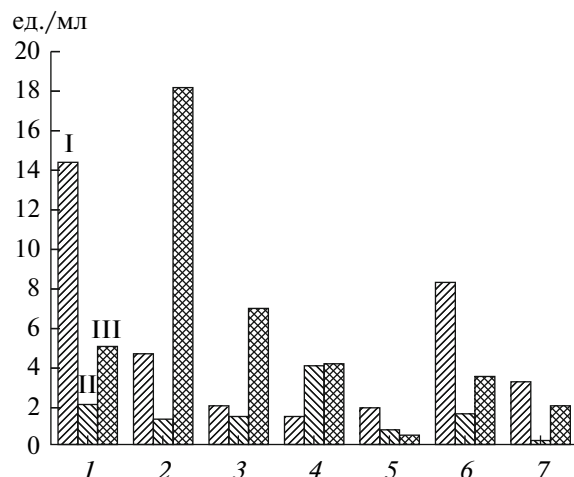


Рис. 2. Среднесуточная лакказная активность, определенная при глубинном культивировании грибов *A. faginea* 1998 (1), *C. caperata* 0677 (2), *L. betulina* 2047 (3), *P. lycii* 2142 (4), *P. ostreatus* 0432 (5), *S. murashkinskyi* 1963 (6), *T. gibbosa* 1911 (7) на средах С-А (I), Г-П (II) и Г-П + Cu (III).

For – LacA2 Rev. ПЦР продукты амплифицировались во всех исследуемых и контрольных геномах грибов, и их размер составил около 550 п.н. (рис. 3б). Таким образом, в геномах всех исследованных в работе базидиомицетов обнаружены экспрессирующиеся гены лакказ (рис. 4). Однако в случае штаммов *P. avellanea* 2009 и *X. radicata* 1795 для синтеза лакказ в условиях глубинного культивирования, по-видимому, необходима оптимизация условий культивирования, поскольку биосинтез этого фермента у разных штаммов грибов белой гнили может различаться и зависеть от многочисленных факторов, в том числе от вида и содержания источников углерода и азота, от наличия индукторов в среде, от фазы биологического цикла гриба и др. [29].

Кластерный анализ. Результаты древовидной кластеризации (рис. 5) показали, что все исследованные в данной работе штаммы грибов можно разделить на две большие группы, обитающие в природе на древесине лиственных пород деревьев разной степени разложения (табл. 1). Анализ экологии грибов, формирующих данные группы, показал, что в первую группу попадают грибы семейств Pleurotaceae, Polyporaceae и Phanerochaetaceae, являющиеся раневыми первичными ксилотрофами или обитателями мертвой, но не сильно разрушенной древесины, а во вторую – семейств Marasmiaceae, Peniophoraceae, Steccherinaceae – вторичные ксилотрофы, предпочитающие уже сильно разложившуюся древесину. Сравнение лигнолитической активности исследуемых штаммов и результатов кластеризации показало, что наиболее активные грибы-лигнолитики относятся к первой группе, что позволяет проводить первичный скрининг эффективных продуцентов лигнолитических фер-

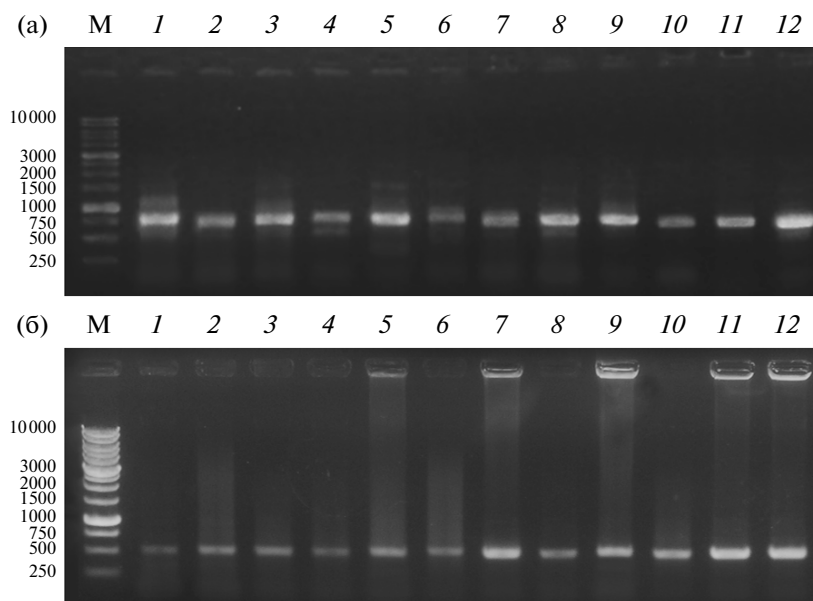


Рис. 3. Электрофорез продуктов амплификации, полученных с помощью ПЦР с использованием праймеров LacA2 For – LacA2 Rev хромосомной ДНК (а) и кДНК (б) исследуемых и контрольных штаммов грибов в 1.2%-ном агарозном геле. 1 – *A. faginea* 1998; 2 – *C. caperata* 0677; 3 – *L. betulina* 2047; 4 – *P. avellanea* 2009; 5 – *P. ostreatus* 0432; 6 – *P. lycii* 2142; 7 – *S. murashkinskyi* 1963; 8 – *T. gibbosa* 1911; 9 – *T. hirsuta** 072; 10 – *T. maxima** 0275; 11 – *T. ochracea** 093; 12 – *X. radicata* 1795; М – ДНК маркеры 1кВ. * – контрольные штаммы.

ментов среди грибов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам.

Таким образом, в результате проведенного скрининга обнаружены обладающие высокими лигнолитической активностью и деградационным потенциалом штаммы базидиальных грибов *Corioloropsis ca-*

perata 0677, *Lenzites betulina* 2047, *Pleurotus ostreatus* 0432 и *Trametes gibbosa* 1911 – перспективные для дальнейшего использования в биотехнологии.

Работа подготовлена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 11-04-01539, № 11-04-01704), Министерства образования и науки РФ в

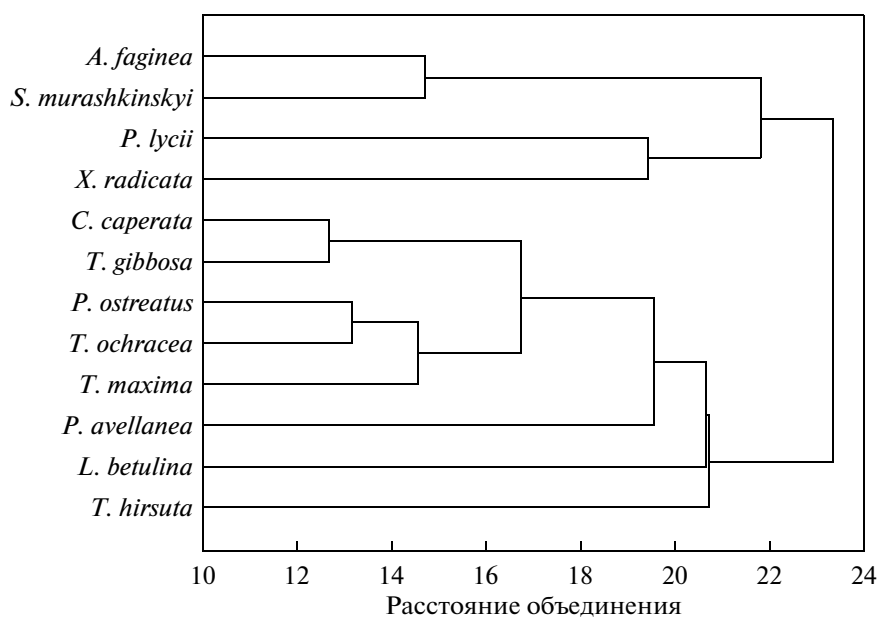


Рис. 5. Древовидная кластеризация исследуемых и контрольных штаммов грибов по лигнолитической активности, определенной методом быстрого скрининга, скорости роста и среднесуточной лакказной активности в процессе глубинного культивирования.

рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы” (государственный контракт № 14.512.11.0067) и Программы ОБН РАН “Биологические ресурсы России”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лантев Л.П., Чаплиев В.Н., Гришин В.Т. // Целлюлоза. Бумага. Картон. 2004. № 1. С. 82–83.
2. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Т. 1. Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. 264 с.
3. Rezacova V., Hrselova H., Gryndlerova H., Miksik I., Gryndler M. // Soil Biol. Biochem. 2006. V. 38. P. 2293–2299.
4. Solaraska S., May T., Roddick F.A., Lawrie A.C. // Chemosphere. 2009. V. 75. P. 751–758.
5. Lundell T.K., Makela M.R., Hilden K. // J. Basic Microbiol. 2010. V. 50. P. 5–20.
6. Pinedo-Rivilla C., Aleu J., Collado I.G. // Curr. Org. Chem. 2009. V. 13. P. 1194–1214.
7. Rubilar O., Tortella G., Cea M., Acevedo F., Bustamante M., Gianfreda L., Diez M.C. // Biodegradation. 2011. V. 22. P. 31–41.
8. Hernandez-Luna C.E., Gutiérrez-Soto G. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 24. P. 465–473.
9. Nikiforova S.V., Pozdnyakova N.N., Makarov O.E., Chernyshova M.P., Turkovskaya O.V. // Microbiology. 2010. V. 79. P. 456–460.
10. Kachlishvili E., Khardziani T., Metreveli E., Kobakhidze A., Elisashvili V. // J. Waste Conversion, Bioproducts & Biotechnology. 2012. V. 1. P. 9–15.
11. Marr C.D. // Mycotaxon. 1979. V. 9. P. 244–276.
12. Nobles M.K. // Can. J. Botany. 1965. V. 43. P. 1097–1139.
13. Šaššek V. // Karstenia. 1978. V. 18. P. 49–52.
14. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications / Ed. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White. New York, USA: Academic Press Inc., 1990. P. 315–322.
15. Archibald F.S. // Appl. Environ. J. Microbiol. 1992. V. 58. P. 3110–3116.
16. Leonowicz A., Grzywnowicz K. // Enzyme Microbial Technol. 1981. V. 3. P. 55–58.
17. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // Nucleic Acids Research. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
18. Stalpers J.A. // Studies in Mycology. 1978. V. 16. P. 1–248.
19. Okino L.K., Machado K.M.G., Fabris C., Bononi V.L.R. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 16. P. 889–893.
20. Pointing S.B. // Fungal Diversity. 1999. V. 2. P. 17–33.
21. Daniel G., Volc J., Kubatova E. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 2524–2532.
22. Gold M.H., Alic M. // Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 1993. V. 57. P. 605–622.
23. Pointing S.B., Pelling A.L., Smith G.J.D., Hyde K.D., Reddy C.A. // Mycol. Researches. 2005. V. 109. P. 115–129.
24. Varela E., Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1546. P. 107–113.
25. Peláez F., Martínez M.J., Martínez A.T. // Mycol. Research. 1995. V. 99. P. 37–42.
26. Valderrama B., Oliver P., Medrano-Soto A., Vazquez-Duhalt R. // Antonie van Leeuwenhoek. 2003. V. 84. P. 289–299.
27. D'Souza T.M., Boominathan K., Reddy C.A. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 3739–3744.
28. Черкашин Е.А., Степанова Е.В., Ландесман Е.О., Королёва О.В., Тишков В.И. // Докл. РАН. 2007. Т. 157. С. 348–351.
29. Elisashvili V., Kachlishvili E. // J. Biotechnol. 2009. V. 144. P. 37–42.

Comparative Analysis of the Ligninolytic Potential of Basidiomycetes Belonging to Different Taxonomic and Ecological Groups

T. V. Fedorova^a, N. V. Shakhova^b, O. I. Klein^a, O. A. Glazunova^a, L. G. Maloshenok^a,
N. A. Kulikova^{a, c}, N. V. Psurtseva^b, and O. V. Koroleva^a

^a Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

e-mail: fedorova_tv@mail.ru

^b Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 197376 Russia

^c Department of Soil Science, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

Received June 7, 2013

Abstract—Screening of the ligninolytic activity of basidiomycetes from the Culture Collection of the Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, belonging to different taxonomic and ecological groups was performed. The patterns of the position of taxa of active producers of ligninolytic enzymes in the modern system of fungi were identified. Cluster analysis showed that the group of fungi with the greatest ligninolytic and degradation potential includes representatives of the families Pleurotaceae, Polyporaceae, and Phanerochaetaceae, which perform the first stages of wood decomposition. As a result, species of interest for the further study of their oxidative potential and use in biotechnology were selected.