

УДК 579.222

## ТРАНСФОРМАЦИЯ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ВЫСОКООКИСЛЕННОГО БУРОГО УГЛЯ БАЗИДИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

### *Trametes hirsuta* И *Trametes maxima*

© 2013 г. О. И. Кляйн\*, Н. А. Куликова\*\*\*, А. И. Константинов\*\*\*, Т. В. Фёдорова\*,  
Е. О. Ландесман\*, О. В. Королёва\*

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

e-mail: klein\_olga@list.ru

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

\*\*\*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991

Поступила в редакцию 19.09.2012 г.

Исследована способность базидиальных грибов белой гнили *Trametes hirsuta* и *Trametes maxima* трансформировать гуминовые вещества (ГВ) угля в условиях твердофазного культивирования в присутствии и отсутствие легкодоступного источника углерода (глюкоза). Показано, что в процессе роста выбранных штаммов грибов на средах, содержащих ГВ, одновременно протекают деструктивные и конденсационные процессы трансформации ГВ. На основании сравнительного физико-химического анализа исходных и трансформированных грибами ГВ установлено, что, хотя внесение глюкозы может способствовать более глубокой трансформации ГВ базидиомицетами, общее направление их модификации – преимущественное восстановление или окисление – определяется физиолого-биохимическими особенностями штамма.

DOI: 10.7868/S0555109913030100

С того момента, когда Коэн и Габриель в 1982 г. впервые показали, что грибы могут расти непосредственно на угле и метаболизировать его [1], процессы биологической конверсии угля, прежде всего, бурого, являются предметом многочисленных исследований [2–7].

В последнее время интерес к биоконверсии угля неуклонно растет, что обусловлено негативными последствиями для окружающей среды, возникающими при использовании угля в качестве источника энергии. Особенно актуальна эта проблема для стран, характеризующихся высоким уровнем производства угля, к которым относится и Россия, занимающая второе место после ФРГ по этому показателю. Производство бурого угля в нашей стране составляет около 90 млн. т в год [8]. По сравнению с конверсией химическими или физическими методами, микробиологические и энзиматические способы обладают рядом преимуществ, такими, как отсутствие необходимости создания повышенных температур и давления [9].

Несмотря на перспективность использования биологического подхода для конверсии угля, его разработка требует тщательного выбора микроорганизма, на основе которого планируется создание технологий биоконверсии. Это обусловлено особенностями угля как субстрата, накладывающими целый ряд ограничений на предлагаемый микроорганизм. Одно из основных свойств угля – его

токсичность, которая затрудняет его биodeградацию, объясняется присутствием труднодеградируемых соединений, например, полиядерных ароматических углеводородов, а также высокая гетерогенность структуры и твердофазное состояние [8]. Указанные негативные, с точки зрения биотрансформации, свойства угля определяют относительно небольшой спектр микроорганизмов, способных к его разложению, к которым, прежде всего, относятся базидиальные грибы – продуценты лигнолитических ферментов. Они принадлежат к немногочисленной группе микроорганизмов, обладающих уникальной системой экстрацеллюлярных лигнолитических ферментов и способных благодаря этому разрушать труднодеградируемые вещества со сложной структурой фенольной природы, такие, как лигнин и уголь. Установлено, что ведущую роль в этом процессе играет лигниндеградационная система, в которую входят ферменты лигнолитического комплекса: лигнинпероксидаза, Mn-пероксидаза и лакказы, а также низкомолекулярные вторичные метаболиты [10–14]. Эффективность процесса деградации лигнина под действием этой системы в значительной мере зависит от доступности источника углерода. Показано, что присутствие в питательной среде легкодоступного источника углерода интенсифицирует процесс биodeградации лигнина [14]. Однако взаимосвязь между

эффективностью деградации угля и составом питательной среды остается неизученной.

Цель работы – сравнительное изучение биодеградации бурого угля под действием продуцентов высокоактивных пероксидаз и лакказ – базидиомицетов *Trametes hirsuta* и *Trametes maxima* на полной питательной среде и при недостатке легкодоступного источника углерода (бедная среда).

### МЕТОДИКА

При проведении экспериментов использовали штаммы *T. hirsuta* (Wulf.:Fr.) Pil. и *T. maxima* (Mont.) David & Rajchenb из коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Для изучения деградации угля выбранными штаммами базидиальных грибов проводили их твердофазное культивирование на угле высокой степени разложения – леонардите (Солнцевское месторождение, о. Сахалин) согласно [15].

При твердофазном культивировании в колбы объемом 750 мл вносили 20 г измельченного леонардита с размером частиц  $\leq 1$  мм и 5 мл полной или бедной питательной среды. При выращивании грибов на полной среде использовали питательную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 10.0; пептон 3.0;  $\text{NaNO}_3$  – 3.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.6;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.001;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.4;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.0005;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.05;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5;  $\text{CaCl}_2$  – 0.5;  $\text{CuSO}_4$  – 0.25; pH 6.0). Среда без легкодоступного источника углерода (бедная) имела аналогичный состав, но не содержала глюкозы. Далее проводили засев субстрата мицелием базидиальных грибов (объем инокулята 20 мл). В ходе эксперимента влажность в колбах поддерживали на уровне 80–90%. Стерилизацию угля проводили путем автоклавирования (120°C, 1 атм., 30 мин). Культивирование проводили в течение 30 сут при 28°C.

Для оценки функционального состояния выращиваемых базидиальных грибов при культивировании проводили мониторинг основных ферментов, входящих в лигнолитический комплекс: лигнинпероксидазы, Mn-пероксидазы и лакказы.

**Определение активности лигнинпероксидазы.** Активность фермента оценивали по скорости окисления вератрового спирта до вератрового альдегида, измеряя снижение поглощения при 310 нм в 0.1 М Na-тарtratном буфере, pH 3.0 [16].

**Определение активности Mn-пероксидазы.** Активность фермента определяли согласно [17], используя в качестве субстрата  $\text{Mn}^{2+}$ . За единицу активности принимали окисление 1 мкмоль Mn(II) за 1 мин.

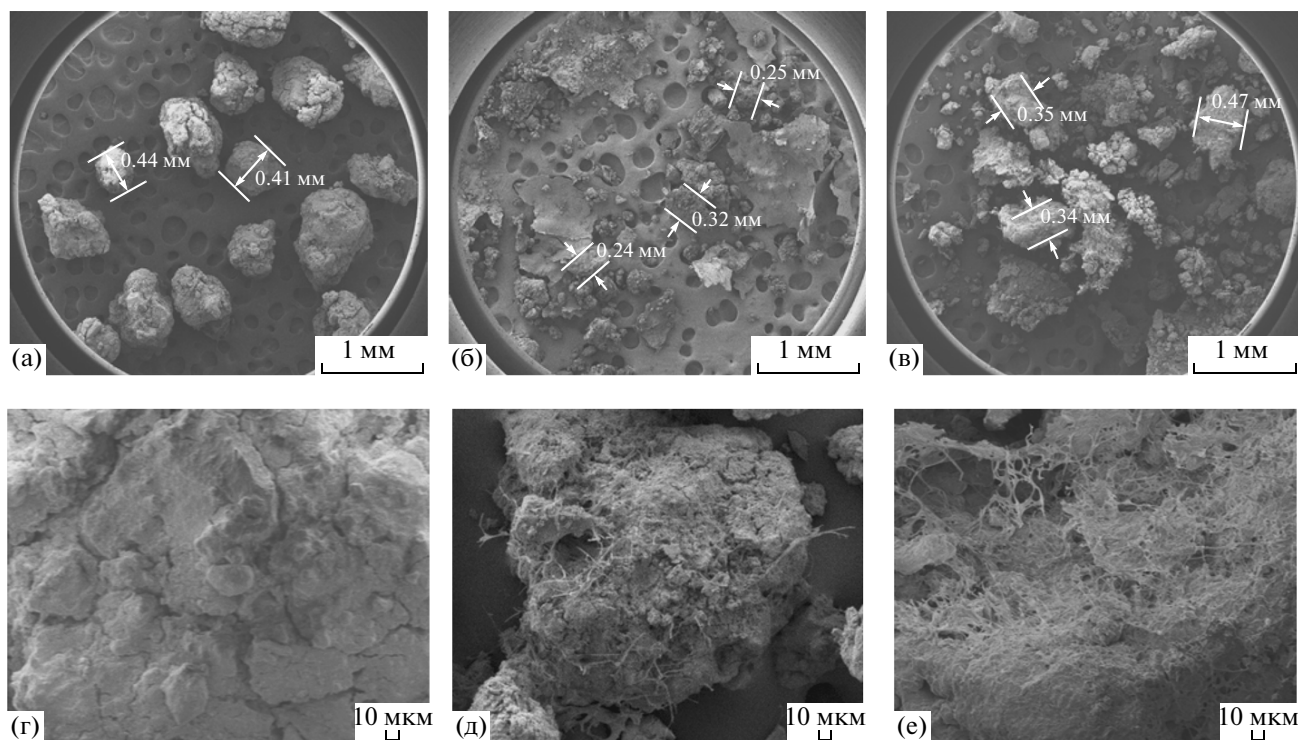
**Определение активности лакказы.** Активность лакказы определяли спектрофотометрически при длине волны 410 нм, используя в качестве хромогенного субстрата 10 мМ катехол в 0.1 М Na-аце-

татном буфере, pH 4.5 [18]. За условную единицу активности принимали увеличение оптической плотности на 1 ед. за 1 мин. Скорости ферментативных реакций регистрировали на спектрофотометре “PerkinElmer” (США). Для перевода ферментативных активностей в международные единицы (МЕ) проводили нормирование условных единиц на коэффициент экстинкции использованного субстрата.

Для контроля структурных изменений леонардита при культивировании базидиальных грибов, после окончания эксперимента проводили выделение из него гуминовых веществ (ГВ) и последующую характеристику их физико-химических свойств. Для этого к леонардиту прибавляли 0.1 М NaOH в весовом соотношении 1 : 2, получаемую кашеобразную массу количественно переносили в диализный мешок с размером пор 12–14 кДа и диализовали против дистиллированной воды 48 ч с многократной сменой воды при комнатной температуре для удаления избытка щелочи. Затем ГВ центрифугировали в течение 20 мин при 3000 g и собирали супернатант. Полученный раствор ГВ высушивали в сушильном шкафу при температуре 50°C. В качестве контрольного образца использовали ГВ, полученные из леонардита, прошедшего аналогичную обработку (автоклавирувание, добавление питательных сред, инкубирование), но без внесения грибов. Характеристику основных физико-химических свойств ГВ проводили по таким параметрам, как элементный состав, молекулярная масса и структурно-групповой состав.

**Элементный анализ.** Анализ С, Н и N был выполнен на элементном анализаторе модели 1106 фирмы “Carlo Erba Strumentazione” (Италия). Содержание кислорода рассчитывали по разнице между массой навески и суммарным содержанием золы и CHN. Зольность определяли сжиганием препарата в муфельной печи (850°C, 40 мин).

**Определение молекулярной массы.** Молекулярную массу ГВ определяли с помощью эксклюзивной хроматографии по методике, описанной в работе [19]. Фракционирование препаратов осуществляли на колонке, заполненной гелем Тоуоpearl-NW-50(S) (Япония), в качестве калибровочных веществ использовали полистиролсульфонаты с молекулярными массами 4.48, 14.0, 20.7, 45.1 и 80.8 кДа (“Polymer Standard Service” Германия). Концентрация ГВ в анализируемых пробах составляла 40 мг/л. Подвижной фазой служил фосфатный буфер (0.028 М, pH 6.8), скорость элюирования составляла 1 мл/мин. Регистрацию ГВ на выходе из колонки проводили с помощью УФ-детектора по поглощению при 254 нм. Расчет средневесовых молекулярных масс (ММ) проводили с помощью программы GelTreat [20].



**Рис. 1.** РСЭМ образцов леонардита после взаимодействия со штаммами *T. hirsuta* + *T. maxima*; а, г – контроль; б, д – на среде без глюкозы; в, е – на среде с глюкозой, а, б, в –  $\times 25$ , г, д, е –  $\times 300$ .

**Структурно-групповой состав ГВ.** Анализ структурно-группового состава ГВ проводили методом  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопии. Спектры регистрировали на спектрометре Avance (“Bruker”, ФРГ) при времени задержки 4 с. Указанное время задержки позволяет достичь полной релаксации ядер углерода практически всех типов, что обеспечивает количественность получаемых  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектров [21]. Концентрация ГВ в измеряемых пробах составляла около 30 г/л. Содержание углерода различных структурных фрагментов определяли интегрированием соответствующих спектральных областей (м.д.): 5–108 – атомы С-незамещенных, О- и N-замещенных алифатических фрагментов ( $\Sigma\text{C}_{\text{Alk}}$ ), 108–165 – атомы С-незамещенных, О- и N-замещенных ароматических фрагментов ( $\Sigma\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 165–187 – атомы С карбоксильных и эфирных групп ( $\text{C}_{\text{COO}}$ ), 187–220 – атомы С кетонных и хинонных групп ( $\text{C}_{\text{C=O}}$ ).

**Растровая сканирующая электронная микроскопия (РСЭМ).** Для визуализации изменений, происходящих с леонардитом, использовали метод РСЭМ. Частицы леонардита после окончания совместного культивирования исследуемых штаммов высушивали до постоянной массы при  $50^\circ\text{C}$ , помещали на титановый столик и фиксировали при помощи проводящего двухстороннего скотча. Для получения изображений поверхности угля использовали сканирующий электронный микроскоп вы-

сокого разрешения с автоэмиссионным катодом JSM-7500F фирмы “JEOL” (Япония). Изображения получали в режиме низкоэнергетических вторичных электронов, поскольку этот режим обеспечивал наиболее высокое разрешение. При энергии первичного пучка 1 кэВ разрешение составляло 1.5 нм, при 5 кэВ – 1 нм. Перед микрофотографированием на образцы наносили металлическую пленку платины толщиной порядка 5 нм методом магнетронного распыления.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты РСЭМ, исследованные штаммы базидиальных грибов активно взаимодействовали с леонардитом, что приводило к заметному разрыхлению его поверхности (рис. 1а–1в), что является прямым доказательством способности базидиальных грибов деградировать угли высокой степени разложения, используя их в качестве источника питательных веществ. Ранее способность к биосольюбилизации углей была продемонстрирована у таких базидиальных грибов, как *Gymnopus erythropus* [22], *Clitocybula dusenii* и *Nematoloma frowardii* [23], *Phanerochaete chrysosporium* [24], *Trametes versicolor* и *Lentinula edodes* [25].

При большем увеличении (рис. 1г, д, е) хорошо видно систему гиф, демонстрирующую рост исследуемых грибов на леонардите. На среде без глюкозы видны отдельные гифы на поверхности

**Таблица 1.** Элементный состав и ММ исходных и трансформированных базидиальными грибами *T. hirsuta* и *T. maxima* ГВ

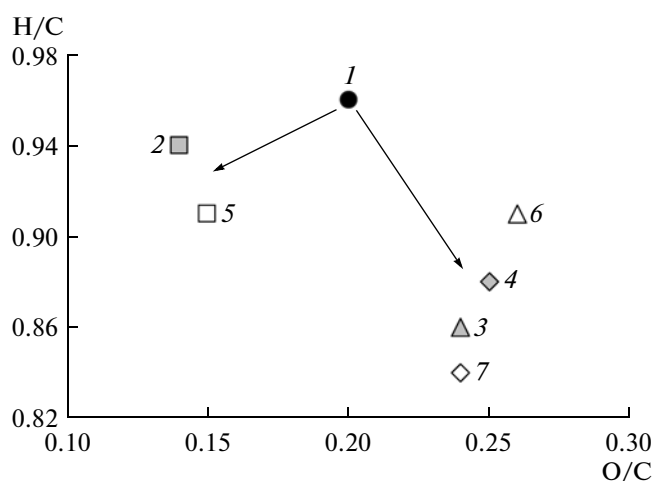
Вариант	Содержание, %				ММ, кДа
	С	Н	N	зольность	
Контроль	72.4	5.8	3.3	22.4	14.3
	Среда без глюкозы				
<i>T. hirsuta</i>	75.3	5.9	3.6	22.5	26.9
<i>T. maxima</i>	70.4	5.1	3.1	20.2	28.5
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	69.5	5.1	2.9	19.9	25.1
	Среда с глюкозой				
<i>T. hirsuta</i>	73.9	5.6	3.7	21.2	31.0
<i>T. maxima</i>	69.2	5.2	3.0	19.7	22.7
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	70.0	4.9	3.2	19.5	25.7

и гифы, проросшие внутрь частиц леонардита, тогда как на полной среде, где рост грибной культуры был более интенсивный, мицелий образовывал пленку на поверхности угля. Интенсивный поверхностный рост базидиомицетов не позволил визуализировать их рост внутрь леонардита.

Исследование элементного состава исходных и трансформированных ГВ леонардита показало, что наблюдаемые изменения определяются только использованным штаммом, но мало зависят от наличия в среде легкодоступного источника углерода. В случае культивирования *T. hirsuta* изменения содержания углерода и водорода практически не наблюдали, в то время как для *T. maxima* происходило снижение содержания водорода и углерода в ГВ (табл. 1). Принимая во внимание, что содержание азота практически не изменялось, можно предположить, что культивирование *T. hirsuta* сопровождается частичным восстановлением ГВ, а культивирование *T. maxima* — их окислением.

Для проверки высказанного предположения были рассчитаны атомные отношения О/С и Н/С, позволяющие оценить степень окисленности и степень ненасыщенности ГВ. Результаты расчетов, представленные на диаграмме ван Кревелена (рис. 2), показывают, что изменение свойств ГВ происходило в двух направлениях. В случае *T. hirsuta* одновременно снижались оба исследуемых атомных отношения, т.е. модификация ГВ этим штаммом базидиомицета протекала по пути восстановления и дегидратации. При трансформации ГВ под действием *T. maxima* или в варианте совместного культивирования *T. hirsuta* и *T. maxima* также наблюдали снижение отношения Н/С, но при этом одновременно происходил рост показателя О/С, т.е. можно предполагать протекание окислительных процессов, таких, как карбоксилирование.

Связь между трансформацией ГВ и восстановительной способностью грибов была ранее продемонстрирована для большого количества базидиомицетов, включая представителей родов *Polystictus*, *Huophiloma*, *Trametes* и *Polyporus* [10]. На основании скрининга более чем 20 штаммов грибов было установлено, что способностью обесцвечивать растворы ГВ обладают только штаммы, в присутствии которых наблюдается восстановление оксibenзойных и метоксибензойных кислот до первичных спиртов. Таким образом, восстановление следует рассматривать как обязательный этап деградации ГВ базидиальными грибами. Предполагается, что за процессы восстановления может отвечать целлобиозодегидрогеназа — флавоцитохром, способный осуществлять процессы одно-



**Рис. 2.** Диаграмма Ван Кревелена для исходных (1) и трансформированных базидиальных грибами *T. hirsuta* и *T. maxima* ГВ леонардита. 2–4 — среда без глюкозы, 5–7 — среда с глюкозой. 2, 5 — *T. hirsuta*; 3, 6 — *T. maxima*; 4, 7 — *T. hirsuta* + *T. maxima*.

**Таблица 2.** Структурно-групповой состав исходных и трансформированных базидиальными грибами *T. hirsuta* и *T. maxima* ГВ

Вариант	Содержание, %				$\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$
	$\Sigma C_{Alk}$	$\Sigma C_{Ar}$	$C_{COO}$	$C_{C=O}$	
Контроль	31.7	46.0	18.3	4.5	1.5
	Среда без глюкозы				
<i>T. hirsuta</i>	27.7	52.8	15.3	4.2	1.9
<i>T. maxima</i>	28.3	45.3	18.1	8.3	1.6
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	19.9	56.1	18.6	5.4	2.8
	Среда с глюкозой				
<i>T. hirsuta</i>	26.5	47.6	18.3	7.5	1.8
<i>T. maxima</i>	21.2	53.8	18.9	6.1	2.5
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	28.1	42.8	16.7	12.5	1.5

электронного восстановления ароматических радикалов или двухэлектронного восстановления хинонов с параллельным окислением полуацетального гидроксила сахаров до карбонила [26]. Следовательно, восстановление ароматических кислот до спиртов можно считать первым этапом трансформации ГВ базидиальными грибами.

Во всех исследованных вариантах было отмечено снижение отношения Н/С, что указывает на уменьшение доли алифатических цепочек в структуре ГВ. Интересно отметить, что изменения, наблюдаемые при модификации ГВ в присутствии *T. hirsuta*, аналогичны изменениям, характерным при переходе от фульво- к гуминовым кислотам почв, тогда как трансформация ГВ под действием *T. maxima* аналогична процессам, протекающим при формировании фульвокислот из растительных остатков [27].

Возрастание ММ ГВ во всех исследованных вариантах (табл. 1) указывает на процессы полимеризации, происходящие при трансформации ГВ и связанные, по-видимому, с процессами опосредованной ферментативной дегградации, базирующейся на формировании радикалов в качестве основных и побочных продуктов ферментативных реакций с последующим запуском радикальных процессов [28]. Другим объяснением отмеченной полимеризации продуктов частичной дегградации ГВ может являться такая особенность лигнолитического ферментативного комплекса выбранных для исследования штаммов, как присутствие высокоредокспотенциальных лакказ, которые, как правило, обладают конденсирующей активностью по отношению к широкому ряду субстратов фенольной природы [28]. В любом случае, полученные данные свидетельствуют об одновременном протекании деструктивных и конденсационных процессов в ГВ при их трансформации *T. hirsuta* и *T. maxima*. Аналогичная разнонаправленность процессов была ранее показана при изучении взаи-

модействия базидиальных грибов белой гнили с лигнинами [26]. Было установлено, что лигнины осиновой и лиственничной древесины, подвергшиеся трансформации под действием *Phanerochaete sanguinea*, могли иметь ММ, превышающие ММ лигнинов исходной древесины в 1.5 раза. Анализ показал, что конденсационные процессы преимущественно идут через С5 ароматического кольца.

Исследование структурно-группового состава ГВ методом  $^{13}C$  ЯМР-спектроскопии (рис. 3, табл. 2) подтвердило ранее установленные закономерности и позволило установить более детально изменения, происходящие с ГВ при взаимодействии с исследованными штаммами базидиомицетов. Было обнаружено, что снижение содержания углерода в ГВ практически во всех вариантах обусловлено, главным образом, уменьшением относительного содержания алифатических структурных фрагментов. Об этом свидетельствует как уменьшение показателя  $\Sigma C_{Alk}$ , так рост степени ароматичности  $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ . Исключение составил вариант *T. hirsuta* + *T. maxima* на среде с глюкозой, где падение доли углерода было обусловлено одновременным уменьшением содержания углерода как алифатических, так и ароматических фрагментов, что привело к отсутствию роста показателя степени ароматичности  $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$ . Следовательно, можно предположить, что при использовании базидиальными грибами ГВ в качестве источника питательных веществ, прежде всего, происходит отщепление именно алифатических цепочек, а не ароматических структур. Более выраженное снижение содержания алифатических групп в ГВ при трансформации штаммами *T. hirsuta* и *T. maxima* наблюдали в вариантах полной питательной среды. Это может быть обусловлено как ускоренным ростом биомассы и, как следствие, увеличением продукции лигнолитических ферментов, так и использованием глюкозы в качестве субстрата радикальных реакций.

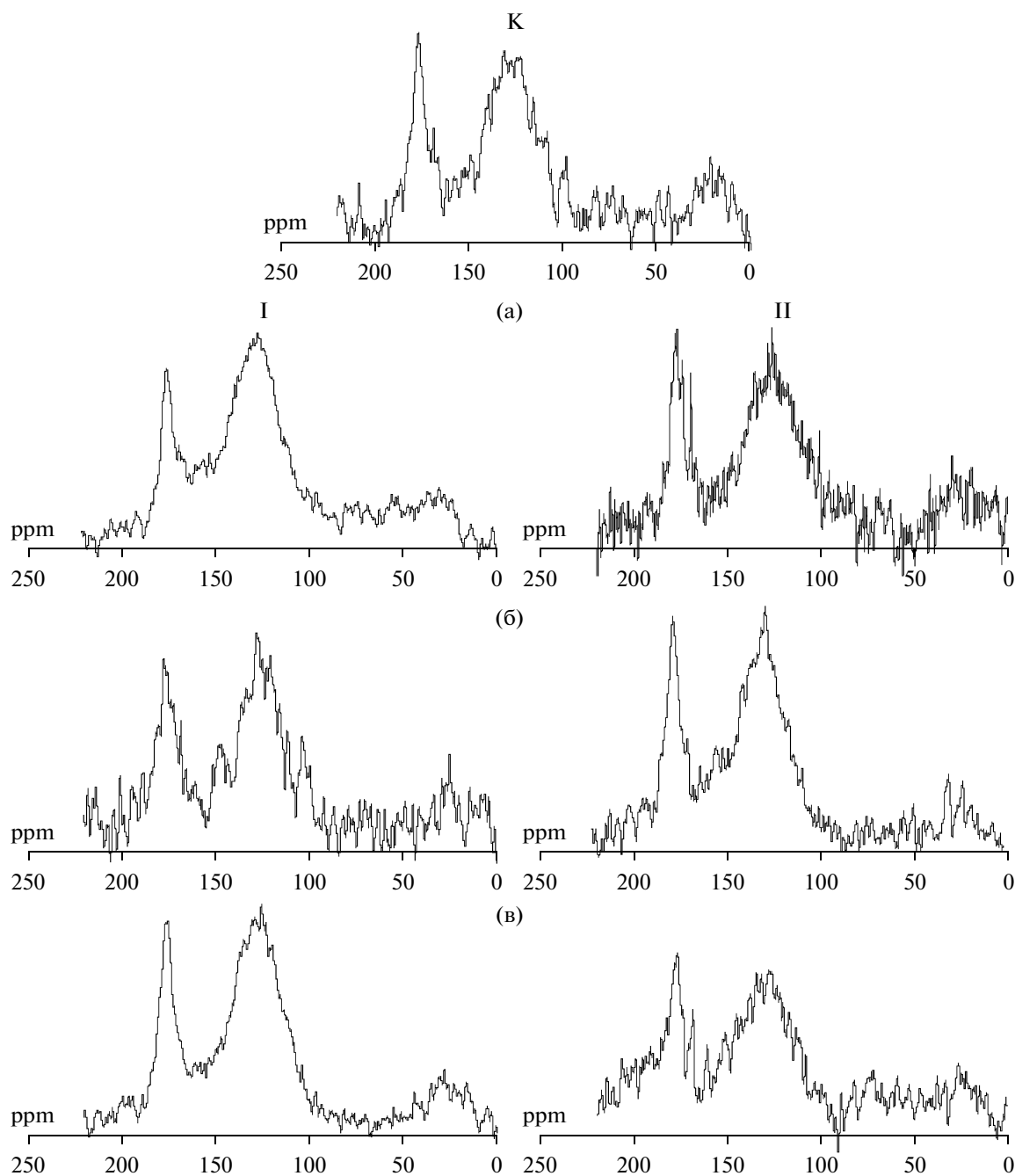


Рис. 3. Спектры <sup>13</sup>C ЯМР исходных (К) и трансформированных базидиальными грибами *T. hirsuta* (а) и *T. maxima* (б), *T. hirsuta* + *T. maxima* (в) ГВ; I – среда без глюкозы, II – среда с глюкозой.

При культивировании *T. hirsuta* на среде без глюкозы было отмечено снижение содержания в ГВ углерода карбоксильных групп  $C_{COO}$ , что согласуется с данными элементного анализа по уменьшению содержания кислорода в ГВ в этих условиях. Это подтверждает высказанное предположение о восстановлении карбоксильных групп до спиртовых на первом этапе деградации ГВ. В присутствии глюкозы содержание углерода карбоксильных групп не изменялось, а кетонных и хинонных

групп – возрастало. Возможно, это указывает на более глубокие процессы деградации ГВ, включающие в себя также окисление спиртов, образовавшихся на первом этапе трансформации, до кетонов. Снижение степени окисленности ГВ, установленное при анализе элементного состава (рис. 2), обусловлено, по-видимому, потерей ГВ кислородзамещенных алифатических фрагментов. Таким образом, присутствие легкодоступного источника

**Таблица 3.** Сравнительная оценка активности лигнинпероксидазы, Mn-пероксидазы и лакказы базидиальных грибов *T. hirsuta* и *T. maxima* при культивировании на леонардите

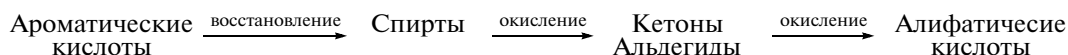
Вариант	Активность, МЕ		
	лигнинпероксидаза, $\times 10^3$	Mn-пероксидаза, $\times 10^3$	лакказа
	Среда без глюкозы		
<i>T. hirsuta</i>	5	18	0.2
<i>T. maxima</i>	6	8	0.3
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	3	7	0.1
	Среда с глюкозой		
<i>T. hirsuta</i>	15	10	0.2
<i>T. maxima</i>	4	8	0.2
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	10	14	1.9

углерода способствует более глубокой трансформации ГВ этим штаммом базидиальных грибов.

При трансформации ГВ штаммом *T. maxima* на бедной среде происходило увеличение относительного содержания углерода кетонных и хинонных групп при одновременном незначительном снижении алифатических, ароматических и карбоксильных фрагментов. Принимая во внимание общее увеличение окисленности по данным элементного анализа (рис. 2), можно предположить, что трансформация ГВ в данном случае протекала по механизму окисления спиртовых групп до кетонов. Так как содержание карбоксильных групп, которые могут служить источником спиртовых групп, при этом не уменьшалось, окислению подвергались

алифатические фрагменты. В присутствии глюкозы содержание  $C_{C=O}$  также возрастало, однако при этом параллельно происходило также и увеличение карбоксильных групп. Это указывает на то, что, как и в случае *T. hirsuta*, внесение легкодоступного источника углерода приводит к более глубокой трансформации ГВ.

Таким образом, проведенный анализ изменений основных физико-химических свойств ГВ при трансформации их исследованными штаммами базидиальных грибов позволяет предположить следующую последовательность основных процессов деградации ГВ под действием ферментов лигнолитического комплекса базидиальных грибов:



Мониторинг ферментативной активности культуральных жидкостей показал, что динамика активности всех трех исследуемых ферментов имела сложный характер и зависела от фазы развития культуры. Поэтому для сравнения использовали средние значения активностей за изучаемый период трансформации ГВ (табл. 3).

Данные, представленные в табл. 3, показывают, что в лигнолитическом комплексе *T. hirsuta* и *T. maxima* наблюдалась преимущественная лакказная активность, что характерно для выбранных штаммов [15]. На среде без глюкозы исследованные штаммы обладали одинаковыми активностями лигнинпероксидазы и лакказы, но различались по активности Mn-пероксидазы, которая была значительно выше у *T. hirsuta*. Ранее было показано, что в этих условиях под действием *T. hirsuta* происходит уменьшение содержания карбоксильных групп в ГВ (табл. 2). Трансформация в этих условиях под действием *T. maxima* не приводила к снижению карбоксильных групп, но способствовала ро-

сту количества кетонных и хинонных фрагментов в ГВ. Следовательно, можно предположить, что под действием Mn-пероксидазы происходило декарбоксилирование ГВ. Действительно, проведенный корреляционный анализ показал, что существует обратная линейная зависимость ( $r^2 = -0.86$ ) между активностью присутствующей в среде Mn-пероксидазы и содержанием карбоксильных групп в трансформированных ГВ (рис. 4). Полученная зависимость хорошо согласуется с данными других исследователей, отмечавших декарбоксилирование ГВ под действием грибной Mn-пероксидазы, катализирующей образование низкомолекулярного медиатора с высоким редокс-потенциалом — хелатированного иона Mn(III) [23].

При выращивании на полной питательной среде активность Mn-пероксидазы и лигнинпероксидазы была выше у *T. hirsuta*, чем у *T. maxima*. Изменение ферментативного профиля привело к тому, что при трансформации ГВ *T. hirsuta* наблюдали более выраженное увеличение содержания кетон-

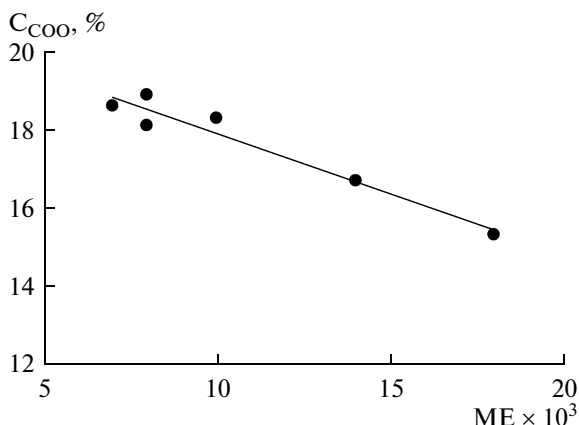


Рис. 4. Корреляционное поле переменных: активность Mn-пероксидазы и содержание углерода карбоксильных групп C<sub>COO</sub> ГВ, трансформированных *T. hirsuta* и *T. maxima*.

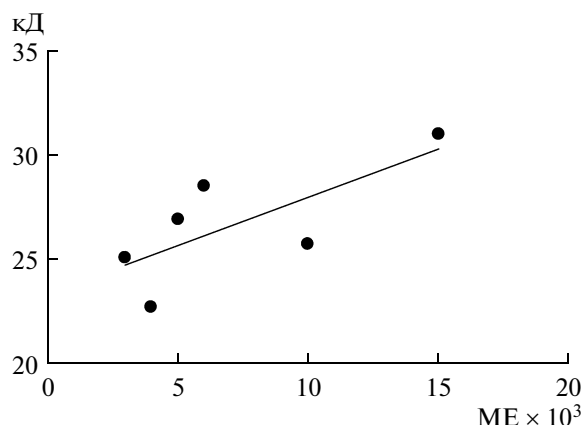


Рис. 5. Корреляционное поле переменных: молекулярная масса ГВ, трансформированных *T. hirsuta* и *T. maxima*, и активность лигнинпероксидазы.

ных и хинонных групп. Следовательно, можно предположить, что лигнинпероксидаза, синтезируемая *T. hirsuta*, отвечает за окисление спиртовых фрагментов в ГВ до кетонов, что соответствует субстратной специфичности лигнинпероксидаз [28].

Интересно отметить, что на двух выбранных питательных средах, наблюдалась положительная линейная зависимость ( $r^2 = 0.73$ ) между активностью лигнинпероксидазы и ММ ГВ (рис. 5). Вероятно, установленное влияние лигнинпероксидазы на ММ ГВ свидетельствует о роли этого фермента в полимеризации продуктов частичной дегградации ГВ.

Проведенное исследование показало, что в случае *T. hirsuta* наличие легкодоступного источника углерода влияет, главным образом, на соотношение в продуцируемом мультиферментном комплексе лигнинпероксидазы и Mn-пероксидазы. При отсутствии глюкозы отмечалась более высокая активность Mn-пероксидазы, а в ее присутствии — лигнинпероксидазы. Изменение соотношения этих ферментов приводило к тому, что процесс восстановительного декарбосилирования ГВ, преобладающий в условиях бедной среды и являющийся, по-видимому, первым этапом трансформации ГВ, менялся на более глубокие процессы окислительной деструкции, приводящие к образованию кетонных фрагментов и алифатических карбоновых кислот. Несмотря на наличие окислительных процессов при трансформации ГВ исследуемым штаммом *T. hirsuta*, в целом как на среде с глюкозой, так и без нее, преобладали восстановительные процессы.

При выращивании *T. maxima* влияние легкодоступного источника углерода на продукцию компонентов мультиферментного комплекса было менее выражено: активность Mn-пероксидазы не менялась, а активность лигнинпероксидазы немного уменьшалась при внесении в питатель-

ную среду глюкозы. Это приводило к меньшему образованию кетонных групп в ГВ и росту содержания карбоксильных фрагментов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие глюкозы в среде способствует более глубокой трансформации ГВ исследованными штаммами базидиальных грибов, однако общее направление модификации — преимущественное восстановление или окисление — определяется физиолого-биохимическими особенностями штамма. Можно предположить, что преобладание восстановительных процессов при трансформации ГВ определялось присутствием в составе комплекса внеклеточных целлюлозодегидрогеназ, однако для проверки этого предположения требуется проведение дополнительных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы” (Соглашение 8111).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cohen M.J., Gabriele P.D. // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. P. 23–27.
2. Scott C.D., Scott T.C., Woodward C.A. // Fuel. 1993. V. 72. P. 1695–1700.
3. Ralph J.P., Graham L.A., Catcheside D.E.A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996. V. 46. P. 226–232.
4. Hölker U., Fakoussa R.M., Höfer M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. V. 44. P. 351–355.
5. Hölker U., Höfer M. // Biotechnol. Lett. 2002. V. 24. P. 1643–1645.
6. Yuan H.L., Yang J.S., Wang F.Q., Chen W.X. // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. V. 42. P. 52–55.
7. Gupta A., Birenda K. // Fuel. 2000. V. 79. P. 103–105.



8. *Fakoussa R.M., Hofrichter M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. P. 25–40.
9. *Faison B.D.* Microbial transformations of lowrank coals / Ed. D.L. Crawford. Boca Raton: CRC Press, 1993. P. 1–26.
10. *Hurst H.M., Burges A., Latter P.* // Phytochemistry. 1962. V. 1. P. 227–231.
11. *Solarska S., May T., Roddick F.A., Lawrie A.C.* // Chemosphere. 2009. V. 75. P. 751–758.
12. *Gramss G., Ziegenhagen D., Sorge S.* // Microbial Ecol. 1999. V. 37. P. 140–151.
13. *Rezacova V., Hrselova H., Gryndlerova H., Miksik I., Gryndler M.* // Soil Biol. Biochem. 2006. V. 38. P. 2293–2299.
14. *Moilanen A.M., Lundell T., Vares T., Hatakka A.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996. V. 45. P. 792–799.
15. *Кляйн О.И., Куликова Н.А., Степанова Е.В., Софьин А.В., Филиппова О.И., Ландесман Е.О., Королева О.В.* // Проблемы агрохимии и экологии. 2011. № 3. С. 36–39.
16. *Marzullo L., Cannio R., Giardina P., Santini M.T., Sanna G.* // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 3823–3827.
17. *Paszczynski A., Grawford R.L., Huynh V.-B.* Methods Enzymology / Eds. W.A. Wood, S.T. Kellogg. N.Y.: Acad. Press, 1988. P. 264–271.
18. *Королева О.В., Явметдинов И.С., Шлеев В.Г., Степанова Е.В., Гаврилова В.П.* // Биохимия. 2001. Т. 66. № 6. С. 618–622.
19. *Perminova I.V., Frimmel F.H., Kudryavtsev A.V., Kulikova N.A., Abbt-Braun G., Hesse S., Petrosyan V.S.* // Environ. Sci. Technol. 2003. V. 37. P. 2477–2485.
20. *Kudryavtsev A.V., Perminova I.V., Petrosyan V.S.* // Anal Chim. Acta. 2000. V. 407. P. 193–202.
21. *Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Петросян В.С.* // Вестник МГУ, сер. 2 (Химия). 2000. № 41. С. 39–42.
22. *Snajdr J., Steffen K.T., Hofrichter M., Baldrian P.* // Soil Biol. Biochem. 2011. V. 42. P. 1541–1548.
23. *Hofrichter M., Ziegenhagen D., Sorge S., Ullrich, R., Bublitz F., Fritsche W.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. P. 78–84.
24. *Kabe Y., Osawa T., Ishihara A., Kabe T.* // Coal Preparation. 2005. V. 25. P. 211–220.
25. *Gotz G.K.E., Fakoussa R.M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. P. 41–48.
26. *Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И.* Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. 1. Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. С. 264.
27. *Орлов Д.С.* Химия почв. М.: Изд-во МГУ, 1985. С. 376.
28. *Куликова Н.А., Кляйн О.И., Степанова Е.В., Королева О.В.* // Прикл. биохимия и микробиология 2011. Т. 47. № 6. С. 619–634.

## Transformation of Humic Substances of Highly Oxidized Brown Coal by the Basidiomycetes Fungi *Trametes hirsuta* and *Trametes maxima*

O. I. Klein<sup>a</sup>, N. A. Kulikova<sup>a, b</sup>, A. I. Konstantinov<sup>c</sup>, T. V. Fedorova<sup>a</sup>,  
E. O. Landesman<sup>a</sup>, and O. V. Koroleva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup> *Lomonosov Moscow State University, Department of Soil Science, Moscow, 119991 Russia*

<sup>c</sup> *Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: klein\_olga@list.ru*

Received September 19, 2012

**Abstract**—The ability of the white rot basidiomycetes *Trametes hirsuta* and *Trametes maxima* to transform coal humic substances (HS's) under the conditions of solid phase cultivation in the presence or absence of an easily available source of carbon (glucose) has been studied. It was shown that during the growth of the fungal strains used in media containing HS's, destructive and condensation processes of HS transformation proceeded simultaneously. Based on a comparative physicochemical analysis of the initial HS's and HS's transformed by the fungi, it was established that, despite the introduction of glucose may favor a deeper transformation of HS's by basidiomycetes, the general direction of their modification is dominant reduction or oxidation and is determined by the physiological biochemical peculiarities of the strain used.