

СЕКЦИЯ 4 ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

ЛИГНИНОЛИТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ – ПЕРСПЕКТИВЫ ДЛЯ БИОРЕФАЙНИНГА

К. И. Половинка, В. М. Травкин, И. П. Соляникова

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
polovinkakseniya@gmail.com*

В данной статье представлен краткий обзор актуальных исследований лигнинолитических бактерий, их поиска и культивирования. Показаны некоторые физиолого-биохимические характеристики лигнинолитических бактерий, дана оценка наиболее перспективным родам и штаммам бактерий-лигнинолитиков.

Ключевые слова: лигнин, бактерии, лакказы, лигнин пероксидазы, деструкция.

Лигнин, второй по распространенности органический полимер на Земле, представляет собой гетерогенный алкил-ароматический сложный комплекс, который является важным компонентом лигноцеллюлозы в клеточной стенке растений. В настоящее время технический лигнин, являющийся нерастворимым отходом промышленного гидролиза древесины и растительных отходов, используется в качестве топлива для производства технологического пара и электроэнергии. Достаточно широкое применение находят лигносульфонаты – растворимые формы лигносульфоновых кислот, которые получают в процессе т.н. сульфитной варки, в основном за счет своей высокой поверхностной активности. Исследования последних лет открывают новые возможности в использовании лигнина как источника значимых компонентов и в индустрии биорефайнинга. Предложено большое число подходов к деполимеризации лигнина, включая термохимическую и ферментативную деструкцию.

Несмотря на природную устойчивость лигнина, некоторые микроорганизмы способны к его деградации. Грибы белой гнили, синтезирующие внеклеточные ферменты, являются основными деструкторами лигнина благодаря своим высокоэффективным ферментативным системам деградации лигнина, включающим лигнинпероксидазу (LiP), марганец пероксидазу (MnP), лакказу, универсальные пероксидазы (VP) и пероксидазы, обесцвечивающие красители (DyPs) [1]. Однако, грибы белой гнили не очень устойчивы в условиях реального технологического процесса, например, при высоких значениях pH, ограничении O₂, высоких концентрациях субстрата. Лакказы используются во многих биотехнологических процессах в бумажной и целлюлозной, текстильной, фар-

мацевтической и нефтехимической промышленности, а также для биоремедиации промышленных отходов. Хотя лакказы распространены повсеместно, исследования были сосредоточены главным образом на грибных ферментах, был идентифицирован ряд изозимов, особенно среди грибов белой гнили.

После идентификации первой бактериальной лакказы было обнаружено много других примеров. Свойства бактериальных лакказ, такие как их энантио-селективность и стабильность при высоком значении рН и высоких температурах еще не изучены в деталях, но они имеют несомненные преимущества для применения в таких областях, как предварительная обработка устойчивой биомассы. Крупномасштабное производство грибных лакказ является сложной задачей из-за медленных темпов роста грибов. Они также имеют более узкий оптимальный диапазон рН. Эти факторы сделали бактериальные лакказы ценной альтернативой грибным ферментам.

Лигнинолитические бактерии выделяют из различных мест обитания, они широко распространены в окружающей среде.

Сообщалось о нескольких штаммах стрептомицетов, способных разлагать лигнин. *Streptomyces viridosporus* T7A является одним из наиболее изученных штаммов, продуцирующих внеклеточные лигнин-деградирующие ферменты, такие как лигнинпероксидазы с активностью более 300 Ед/л [2]. Из лигноцеллюлозы кукурузы культурой *S. viridosporus* T7A образовывался промежуточный продукт, который был идентифицирован как лигнин-производный кислотно-осаждаемый полимерный лигнин (ЛКПЛ), обогащенный фенольными гидроксильными группами [3]. *Streptomyces badius* ATCC 39117 разлагал ¹⁴С-меченый растительный лигнин, и *Streptomyces coelicolor* A3(2) продуцировал ЛКПЛ в среде с травяной лигноцеллюлозой [4]. *Amycolatopsis* sp. 75iv2 (ранее *Streptomyces setonii* и *Streptomyces griseus* 75iv2) при выращивании на хвое, лиственных породах и травяной лигноцеллюлозе, был способен к разложению лигнина на 34, 29 и 39%, соответственно, что было сопоставимо с активностью *S. viridosporus* T7A [5].

К деградации лигнина также способны некоторые виды родококков. С использованием флуоресцентно-модифицированного лигнина обнаружена лигнин-деградирующая активность *Rhodococcus jostii* RHA1 [6]. Авторы сообщили, что штамм непосредственно использует этот лигнин и лигноцеллюлозу соломы пшеницы в качестве единственного источника углерода и перспективен для получения биотехнологически-значимых продуктов, таких как ароматические дикарбоновые кислоты и ванилин [7]. Способность разлагать лигнин была показана для *Rhodococcus erythropolis* при культивировании на нитрат-лигнине пшеницы [7]. *Rhodococcus opacus* DSM 1069 и PD630 проявили лигнинолитическую активность при выращивании на этиловом органосольвентном лигнине в качестве единственного источника углерода [8]. Хотя у штамма PD630 скорость роста была ниже, чем у *R. jostii* RHA1, отличительной особенностью данного штамма был рост на кукурузном лигнине в качестве единственного источника углерода [9].

Важной с биотехнологической точки зрения является способность некоторых лигнинолитических бактерий одновременно солибилизовать углеводы

и разлагать лигнин в составе лигноцеллюлозы. Одним из примеров является *Thermobifida fusca*, аэробный термофил, который содержит ферменты, отвечающие за модификацию лигнина и гидролиз целлюлозы [10]. С использованием штамма *Clostridium thermocellum* в аналогичном эксперименте были получены похожие результаты [11]. *Caldicellulosiruptor bescii*, первоначально выделенный из геотермального бассейна, также привлек интерес исследователей благодаря своей целлюлозно-лигнинолитической активности. Эта бактерия была успешно выращена на необработанной биомассе мятлика лугового при 78 °С и выделяла в питательную среду ряд лигнин-производных ароматических соединений [12]. Кроме того, рекомбинантные *C. bescii*, как и *T. fusca*, использовали необработанную растительную биомассу для производства этанола [13].

Способность разлагать лигнин показана не только для аэробных, но также и для анаэробных бактерий. Из почвы тропических лесов с использованием среды, содержащей крафт-лигнин в качестве единственного источника углерода, выделен факультативно-анаэробный организм *Enterobacter lignolyticus* SCF1. В присутствии ксилозы и лигнина прирост биомассы этого штамма был более, чем в два раза выше по сравнению с культивированием только в присутствии ксилозы. Полученные результаты подтверждены протеомным и транскриптомным анализами, которые показали наличие регуляции четырех ферментов, участвующих в деполимеризации лигнина, таких как ДуР и глутатион S-трансфераза [14]. Другие штаммы *E. aerogenes* и *E. soil* sp. nov. также были выделены из почвы и культивированы на среде, содержащей лигнин в качестве единственного источника углерода. *E. aerogenes* способен усваивать лигнин и производные от лигнина ароматические соединения [15].

Бактерии рода *Pseudomonas* также привлекательны для использования в деполимеризации лигнина в промышленной биотехнологии. После обработки лигнина бактериями *Pseudomonas putida* наблюдалось изменение его морфологии и химических связей при анализе сканирующей электронной микроскопией (СЭМ), что подтверждало уменьшение размера частиц и уменьшение количества гваяцил-блока [16].

Показана способность разлагать лигнин и для представителей рода *Bacillus*. В частности, в последнее время было обнаружено и охарактеризовано несколько изолятов из почвы, осадка и шлама. Почвенная бактерия, идентифицированная как *Bacillus* sp., характеризовалась 99% сходством с *B. cereus* и *B. thuringiensis* по генотипированию 16S рРНК. Численность этой бактерии после 72 ч культивирования на среде с лигнином в качестве единственного источника углерода достоверно увеличивалась [17].

Предложено использование штаммов *Citrobacter freundii* и *Klebsiella* sp. для расщепления лигнина. *C. freundii* при культивировании в монокультуре не показал эффективного роста. Однако, при совместном культивировании с другим штаммом *Citrobacter* sp., выделенным из образца шлама, было обнаружено эффективное обесцвечивание лигнина до 62% [18]. Кроме того, с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) было показано образование новых метаболитов, таких как три-, тетра- и пентахлорфенолы.

Таким образом, анализ литературы, касающейся бактериальной деструкции лигнина, показал, что бактерии являются не менее перспективными для получения комплекса лигнинолитических ферментов, чем грибы. А учитывая их высокие, по сравнению с грибами, скорости роста и накопления биомассы, устойчивость к внешним факторам, можно считать, что они могут быть ценными продуцентами биотехнологически-значимых продуктов.

Библиографический список

1. Upadhyay P., Shrivastava R., Agrawal P. K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase // 3 Biotech. 2016. Vol. 6(1). P. 15.
2. Gottschalk L. M. F., Macedo J. M. B., Bon E. P. S. Lignin peroxidase production by *Streptomyces viridosporus* T7A // Appl. Biochem. Biotechnol. 1999. Vol. 79. P. 771–778. <https://doi.org/10.1385/ABAB:79:1-3:771>
3. Crawford D. L., Pometto A. L., Crawford R. L. Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermediate // Appl. Environ. Microbiol. 1983. Vol. 45. P. 898–904.
4. Roles of small laccases from *Streptomyces* in lignin degradation / S. Majumdar, T. Lukk, J. O. Solbiati, S. Bauer, S. K. Nair, J. E. Cronan et al. // Biochemistry. 2014. Vol. 53. P. 4047–4058. doi: 10.1021/bi500285t
5. Antai S. P., Crawford D. L. Degradation of softwood, hardwood, and grass lignocelluloses by two *Streptomyces* strains // Appl. Environ. Microbiol. 1981. Vol. 42. P. 378–380.
6. Towards lignin consolidated bioprocessing: simultaneous lignin depolymerization and product generation by bacteria / D. Salvachúa, E. M. Karp, C. T. Nimlos, D. R. Vardon, G. T. Beckham // Green Chem. 2015. Vol. 17. P. 4951–4967. doi: 10.1039/C5GC01165E
7. Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples / C. Taylor, E. Hardiman, M. Ahmad, P. Sainsbury, P. Norris, T. Bugg // J. Appl. Microbiol. 2012. Vol. 113, No. 3 P. 521–530. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05352.x
8. Kosa M., Ragauskas A. J. Lignin to lipid bioconversion by oleaginous *Rhodococci* // Green Chem. 2013. Vol. 15. P. 2070–2074. doi: 10.1039/c3gc40434j
9. Lipid production from dilute alkali corn stover lignin by *Rhodococcus* strains / Y. He, X. Li, H. Ben, X. Xue, B. Yang // ACS Sustain. Chem. Eng. 2017. Vol. 5. P. 2302–2311. doi: 10.1021/acssuschemeng.6b02627
10. Structure of *Thermobifida fusca* DyP-type peroxidase and activity towards Kraft lignin and lignin model compounds / R. Rahmanpour, D. Rea, S. Jamshidi, V. Fülöp, T. D. Bugg // Arch. Biochem. Biophys. 2016. Vol. 594. P. 54–60. doi: 10.1016/j.abb.2016.02.019
11. Elucidating the structural changes to Populus lignin during consolidated bioprocessing with *Clostridium thermocellum* / H. O. Akinosho, C. G. Yoo, A. Dumitrache, J. Natzke, W. Muchero, S. D. Brown et al. // ACS Sustain. Chem. Eng. 2017. Vol. 5. P. 7486–7491. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b01203
12. Carbohydrate and lignin are simultaneously solubilized from untreated switchgrass by microbial action at high temperature / I. Kataeva, M. B. Foston, S.-J. Yang, S. Pattathil, A. K. Biswal, Ii F. L. Poole et al. // Energ. Environ. Sci. 2013. Vol. 6. P. 2186–2195. doi: 10.1039/c3ee40932e
13. Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii* / D. Chung, M. Cha, A. M. Guss, J. Westpheling // Proc. Natl. Acad. Sci. 2014. Vol. 111. P. 8931–8936. doi: 10.1073/pnas.1402210111
14. Evidence supporting dissimilatory and assimilatory lignin degradation in *Enterobacter lignolyticus* SCF1 / K. M. DeAngelis, D. Sharma, R. Varney, B. A. Simmons, N. G. Isern, L. M. Markillie et al. // Front. Microbiol. 2013. Vol. 4. P. 280. doi: 10.3389/fmicb.2013.00280

15. Manter D. K., Hunter W. J., Vivanco J. M. *Enterobacter soli* sp. nov.: a lignin-degrading γ -proteobacteria isolated from soil // Curr. Microbiol. 2011. Vol. 62. P. 1044–1049. doi: 10.1007/s00284-010-9809-9
16. Nikel P. I., de Lorenzo V. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: from native biochemistry to *trans*-metabolism // Met. Eng. 2018. Vol. 50. P. 142–155. doi: 10.1016/j.ymben.2018.05.005
17. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential / L. Bandounas, N. J. Wierckx, J. H. De Winde, H. J. Ruijsenaars // BMC Biotechnol. 2011. Vol. 11. P. 94. doi: 10.1186/1472-6750-11-94
18. Chandra R., Bharagava R. N. Bacterial degradation of synthetic and kraft lignin by axenic and mixed culture and their metabolic products // J. Environ. Biol. 2013. Vol. 34. P. 991–999.

БИОДЕГРАДАЦИЯ ЭЛЕМЕНТНОГО ФОСФОРА И ФОСФОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

А. З. Миндубаев¹, Э. В. Бабынин³, Е. К. Бадеева²,
С. Т. Минзанова², И. С. Низамов³

¹ Общество с ограниченной ответственностью Инновационные технологии детоксикации, mindubaev@iopc.ru, mindubaev-az@yandex.ru

² Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова
ФИЦ КазНЦ РАН,

³ ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет

Исследования показали, что микромицет *Aspergillus niger* AM1 способен утилизировать в качестве источников фосфора триамид фосфорной кислоты и замещенный дитиофосфат. Также, в представленной работе впервые описаны попытки увеличить концентрацию белого фосфора в культуральной среде до значений выше 1%. Для этого мы добавляли в культуральные среды оливковое масло, в котором белый фосфор сравнительно хорошо растворим. Оказалось, что в присутствии этого компонента минимальная ингибирующая концентрация белого фосфора резко падает.

Ключевые слова: белый фосфор, соединения фосфора, минимальная ингибирующая концентрация, *Aspergillus niger*.

В предыдущих исследованиях [1, 2] мы впервые наблюдали биodeградацию белого фосфора. Логичным продолжением исследований является расширение спектра исследуемых соединений фосфора, которые могут быть метаболитами белого фосфора, и также усваиваться микроорганизмами. Начало данного цикла работ мы представили в публикации [3].

До сих пор максимальная концентрация белого фосфора в приготовленных нами культуральных средах составляла 1%. Поскольку минимальная ингибирующая концентрация (МИК) данного вещества для аспергиллов до сих пор не была найдена, были основания полагать, что аспергиллы могут расти в средах с концентрацией P₄ более 1%. Это имеет важное практическое значение, поскольку расширяет возможности создаваемого метода. В рамках проведенно-