

## Lignino degradacija rugių šiauduose pradinėse mikromicetų kultivavimo stadijose

**Regina Varnaitė**

*Biodestruktorių tyrimo laboratorija,  
Botanikos institutas,  
Žaliųjų ežerų g. 49,  
LT-08406 Vilnius, Lietuva*

Ištirta lignino degradacijos rugių šiauduose pradinėse mikromicetų kultivavimo stadijose laipsnis, kultivuojant ant jų pavienius mikromicetus ir mikromicetų kompleksus, ir įvertintas jų fenoloksidazinis aktyvumas.

Nustatyta, kad kultivuojant pavienius mikromicetus per 16–20 parų labiau lignino kiekį, palyginus su kitais kultivuotais mikromicetais, sumažino *Galactomyces geotrichum* (atitinkamai 1,53 ir 1,56 karto, palyginus su kontrole). Šiame periode mikromiceto peroksidazinis aktyvumas buvo 3,93 a.v./g, tirozinazinis – 0,025 sąl.v./g, lakazinis – ekst. koef. 0,02.

Mažiausiai pakitęs lignino kiekis (12,5%) buvo nustatytas po mikromiceto *Myrothecium verrucaria* kultivavimo. Peroksidazinis (5,36 a.v./g) ir tirozinazinis (0,324 sąl.v./g) šio mikromiceto aktyvumai buvo didesni, palyginus su *Galactomyces geotrichum* fenoloksidaziniu aktyvumu.

Tyrimai parodė, kad pradinėse mikromicetų kompleksų kultivavimo stadijose ligninas rugių šiauduose degradavo labai lėtai. Lignino kiekį labiau (iki 11,3%) sumažino kompleksas *Galactomyces geotrichum*–*Sporotrichum pruinosum*. Tai buvo 1,43 karto mažiau, palyginus su kontrole. Šio komplekso peroksidazinis aktyvumas buvo 31,87 a.v./g, tirozinazinis – 0,87 sąl.v./g, o lakazinis aktyvumas visai nepasireiškė. Didesnė lignino degradacija (iki 12,18%), palyginus su kitais mikromicetų kompleksais, buvo nustatyta po *Galactomyces geotrichum*–*Myrothecium verrucaria* kultivavimo 20 parų. Peroksidazinis šio komplekso aktyvumas buvo 192,9 a.v./g, tirozinazinis – 1,416 sąl.v./g, lakazinis – ekst. koef. 0,01.

**Raktažodžiai:** mikromicetai, mikromicetų kompleksai, ligninas, fenoloksidazės: peroksidazė, lakazė, tirozinazė

### IVADAS

Natūralių sudėtingų organinių junginių (lignino, celiuliozės) irimo procesas yra vienas svarbesnių biologijos ir dirvotyros problemų. Šių polimerų atsargos gamtoje yra gana didelės. Cheminiu požiūriu tai sudėtingos, organinės kilmės polimerinės sunkiai irstančios medžiagos, sukaupusios didžiules fotosintezės energijos atsargas. Apie 60% šios energijos slypi celiuliozėje ir hemiceliuliozėje. Gamtinėmis sąlygomis šios polimerinės medžiagos tvirtais saitais yra susijungusios su ligninu. Pastarieji junginiai yra labai atsparūs išorės veiksniams, todėl juose sukaupta energija sunkiai prieinama kitiems aplinkos biotams. Jeigu pavyktų susilpninti šį ryšį, augalų atliekos būtų lengviau prieinamos kitoms ekologinės sistemos grandims, padidėtų dirvožemio biologinis aktyvumas (Blanchette, 2000; Hammel, 1989; Score et al., 1997).

Per pastaruosius du dešimtmečius išaugo įvairių žemės ūkio produktų gamyba, o tuo pačiu pa-

didėjo tarša jų atliekomis. Visos augalų atliekų rūšys turi didelį lignino, celiuliozės, hemiceliuliozės kiekį, tačiau šių komponentų kiekis ir santykis yra nevienodas. Žemės ūkio ir įvairių pramonės šakų augalų atliekos yra potenciali augalinė žaliava mikrobiologinei konversijai. Mikromicetų vaidmuo lignino ir celiuliozės komplekso biodegradacijoje yra labai didelis. Todėl jie gali būti panaudoti biotechnologijoje. Mikrobiologinis lignino ardymas – tai galimybių pagausinti pašaruose baltymų paieška, panaudojant jį kaip atsinaujinančią žaliavą (Головлева и др., 1982).

Pagrindiniai fermentai, dalyvaujantys lignino degradacijos procese, yra fenoloksidazės.

Daugiau darbų yra skirta lignino ardymui vėlesnėse mikromicetų kultivavimo stadijose (Raudonienė, Varnaitė, 1998; Irbe et al., 2001; Varnaitė, 1999).

Darbo tikslas buvo nustatyti lignino degradaciją pradinėse mikromicetų kultivavimo stadijose, mikromicetų fenoloksidazinį aktyvumą, siekiant išaiškinti jų gebėjimą sparčiau degraduoti šį kompleksą.

## METODIKA

Bandymuose panaudojome pavienius mikromicetus ir mikromicetų kompleksus – perspektyviausius lignino ir celiuliozės komplekso ardytojus vėlesnėse jų kultivavimo stadijose.

Buvo tiriami pavieniai mikromicetai *Galactomyces geotrichum* (Butler et Petersen) Ditmar ex Fries, *Myrothecium verrucaria* (Alb. et Schweinitz) Ditmar ex Fries, *Papularia sphaerosperma* (Pers) Höhn ir mikromicetų kompleksai: 1. *Galactomyces geotrichum*–*Myrothecium verrucaria*, 2. *Galactomyces geotrichum*–*Sporotrichum pruinosum* (Gilman et Abbott), 3. *Myrothecium verrucaria*–*Sporotrichum pruinosum*, 4. *Dipodascus armillariae* W. Gams–*Verticillium fungicola* (Preuss) Hasselbr., 5. *Papularia sphaerosperma*–*Fusarium redolens* Wr.

Mikromicetai buvo kultivuojami tvirtafazės fermentacijos sąlygomis (ant rugių šiaudų) 20 parų 28°C temperatūroje, labiausiai priartintomis prie natūralių sąlygų. Augalų atliekų biokonversijai paspartinti naudojome mineralinius priedus (10 g orasausės medžiagos pridėjome 0,3 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ir 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

Lignino kiekis augalų atliekose buvo nustatinėjamas Chudiakovos metodu (Худякова, 1984).

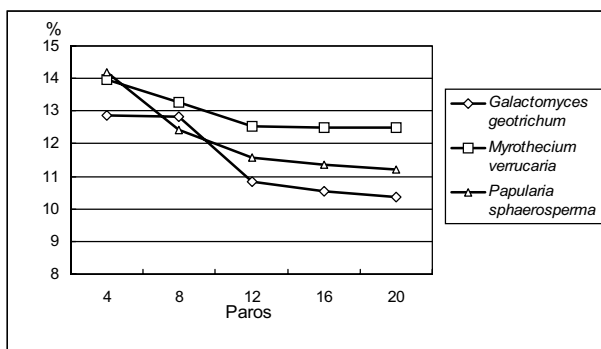
Peroksidazinis aktyvumas buvo nustatinėjamas o-dianizidino reaktyvu (Билай, 1982), tirozinazinis – tirozinu (Ермаков и др., 1987), o lakazinis – p-fenilendiaminochloridu (Ravin, Harward, 1965).

Duomenims apdoroti naudota Excel 97 programa.

## REZULTATAI IR DISKUSIJA

Tyrimai parodė (1 pav.), kad lignino degradacija dėl pavienių mikromicetų kultivavimo įtakos kito skirtingai. Kontroliniuose rugių šiauduose buvo nustatyta 16,2% lignino.

Gautieji tyrimų rezultatai parodė, kad po mikromicetų 4 kultivavimo parų didesnė lignino degradacija (iki 12,88%) buvo nustatyta po *Galactomyces*



1 pav. Lignino degradacija rugių šiauduose po mikromicetų kultivavimo 4, 8, 12, 16, 20 parų

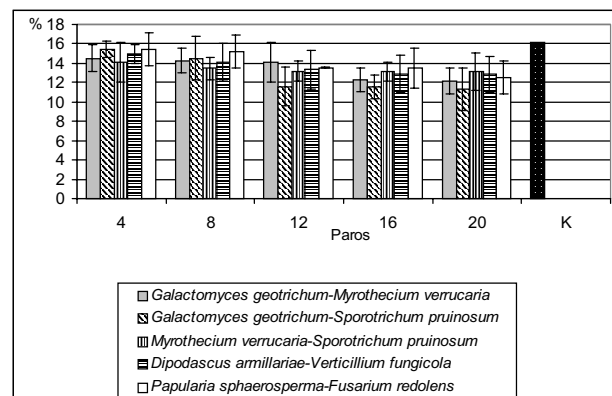
Fig. 1. Lignin degradation in rye straw after 4, 8, 12, 16, 20 days of cultivation of micromycetes

*geotrichum* kultivavimo. Tai sudarė 1,25 karto mažiau, palyginus su kontrole. Šiame periode peroksidazinis mikromiceto aktyvumas buvo 31,1 a.v./g, tirozinazinis – 0,113 sąl.v./g, lakazinis – ekst. koef. 0,035. Toliau kultivuojant (po 8 ir 12 parų) lignino kiekis išliko beveik nepakitęs. Tik po 16 ir 20 parų ligninas vėl degradavo giliau (atitinkamai iki 1,53 ir 1,56 karto, palyginus su kontrole). Mikromiceto fenoloksidazinis aktyvumas sumažėjo: peroksidazinis – iki 3,93 a.v./g, tirozinazinis – iki 0,0249 sąl.v./g, lakazinis – ekst. koef. iki 0,02.

Kultivuojant mikromicetą *Myrothecium verrucaria* ligninas degradavo lėčiau, t. y. po 4 kultivavimo parų šis komponentas degradavo 1,15 karto, palyginus su kontrole. Peroksidazinis šio mikromiceto aktyvumas buvo didelis – 52,7 a.v./g, tirozinazinis – 0,148 sąl.v./g, lakazinis išliko mažas (ekst. koef. 0,028). Toliau kultivuojant ligninas degradavo nežymiai: po 20 kultivavimo parų – 1,15 karto mažiau, palyginus su kontrole. Peroksidazinis mikromiceto aktyvumas sumažėjo iki 5,36 a.v./g, tirozinazinis – padidėjo iki 0,324 sąl.v./g, lakazinis – sumažėjo (ekst. koef. iki 0,01).

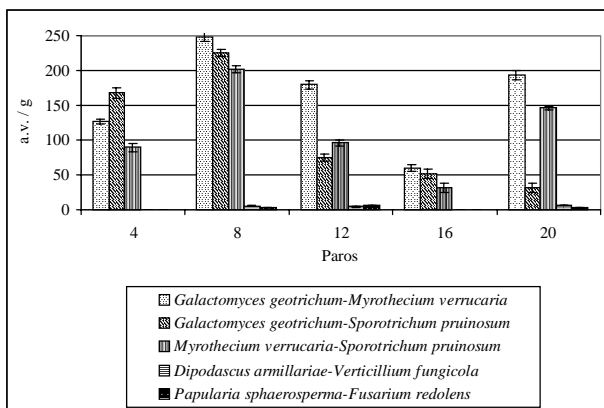
Mažiausiai lignino kiekis buvo pakitęs mikromiceto *Papularia sphaerosperma* kultivavimo pradžioje (iki 14,19%). Tai sudarė tik 1,14 karto mažiau, palyginus su kontrole. Tolimesnio kultivavimo eigoje ligninas degradavo palaipsniui: po 20 kultivavimo parų – 1,44 karto mažiau, palyginus su kontrole.

Gautieji tyrimų rezultatai parodė (2 pav.), kad mikromicetų kompleksus kultivuojant ant rugių šiaudų 4 paras lignino kiekis pakito labai nežymiai. Didesnė lignino degradacija (14,10%) buvo nustatyta po mikromicetų komplekso *Myrothecium verrucaria*–*Sporotrichum pruinosum* kultivavimo. Tai sudarė 1,14 karto mažiau, palyginus su kontrole. Šio komplekso fenoloksidazinis aktyvumas buvo peroksidazinis – 89,3 a.v./g (3 pav.), tirozinazinis – 0,195 sąl.v./g (4 pav.), lakazinis – ekst. koef. 0,005 (5 pav.). Kulti-

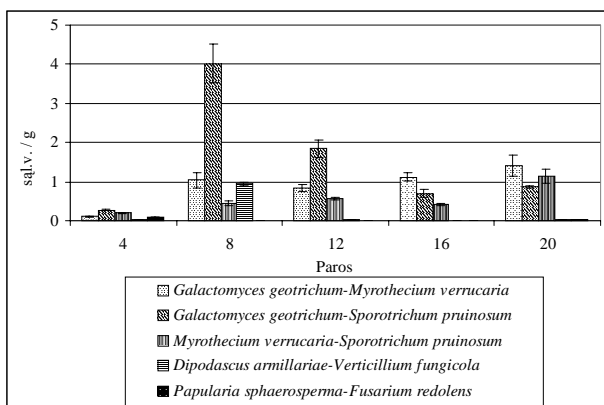


2 pav. Lignino degradacija rugių šiauduose po mikromicetų kompleksų kultivavimo 4, 8, 12, 16, 20 parų

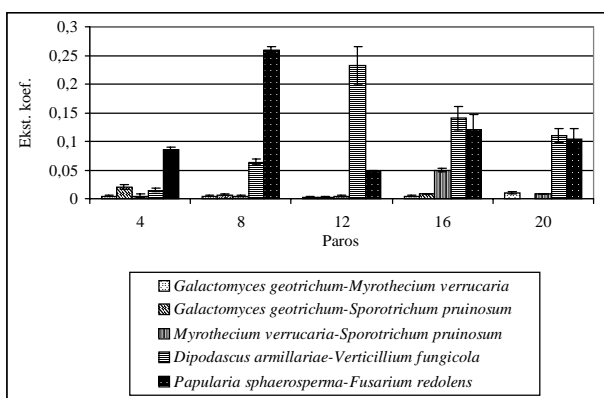
Fig. 2. Lignin degradation in rye straw after 4, 8, 12, 16, 20 days of cultivation of micromycete complexes



3 pav. Mikromicetų kompleksų peroksidazinis aktyvumas po jų kultivavimo ant rugių šiaudų 4, 8, 12, 16, 20 parų  
Fig. 3. Peroxidase activity of micromycete complexes after 4, 8, 12, 16, 20 days of cultivation



4 pav. Mikromicetų kompleksų tirozinazinis aktyvumas po jų kultivavimo ant rugių šiaudų 4, 8, 12, 16, 20 parų  
Fig. 4. Tyrosinase activity of micromycete complexes after 4, 8, 12, 16, 20 days of cultivation



5 pav. Mikromicetų kompleksų lakazinis aktyvumas po jų kultivavimo ant rugių šiaudų 4, 8, 12, 16, 20 parų  
Fig. 5. Laccase activity of micromycete complexes after 4, 8, 12, 16, 20 days of cultivation

vuojant kitus mikromicetų kompleksus lignino kiekis sumažėjo nuo 1,1 iki 1,04 karto, palyginus su kontrole.

Kultivuoiant mikromicetų kompleksus ilgiau (8 paras), lignino kiekis palaipsniui mažėjo. Ir šiame periode jis labiau sumažėjo po mikromicetų komplekso *Myrothecium verrucaria-Sporotrichum pruinosum* kultivavimo (13,47%). Peroksidazinis komplekso aktyvumas šiame periode išaugo iki 202,3 a.v./g; tirozinazinis – iki 0,454 sąl.v./g, lakazinis (ekst. koef. 0,005) išliko nepakitęs.

Mažiausiai pakitęs lignino kiekis, palyginus su kontrole, (15,23%) buvo nustatytas po mikromicetų komplekso *Papularia sphaerosperma-Fusarium redolens* kultivavimo. Šis sumažėjimas sudarė tik 1,06 karto, palyginus su kontrole. Buvo nustatytas labai mažas (3,48 a.v./g) peroksidazinis šio komplekso aktyvumas, tirozinazinis – nepasireiškė, lakazinis – padidėjo (ekst. koef. iki 0,26). Lignino degradacijos dėl kitų mikromicetų įtakos laipsnis buvo tarp didžiausio ir mažiausio lignino kiekio pokyčio.

Kultivuoiant mikromicetų kompleksus 12 parų, lignino kiekį rugių šiauduose labiau sumažino mikromicetų kompleksas *Galactomyces geotrichum-Sporotrichum pruinosum* (iki 11,6%) ir *Myrothecium verrucaria-Sporotrichum pruinosum* (iki 13,18%), t. y. atitinkamai 1,39 ir 1,2 karto mažiau, palyginus su kontrole. Pirmojo komplekso peroksidazinis aktyvumas buvo 75,3 a.v./g, tirozinazinis – padidėjo iki 1,85 sąl.v./g, lakazinis – išliko mažas (ekst. koef. 0,003). Antrojo komplekso peroksidazinis aktyvumas buvo didesnis (96 a.v./g), tirozinazinis – mažesnis, lakazinis – ekst. koef. 0,005. Dėl kitų šiame periode tirtų mikromicetų įtakos lignino kiekis sumažėjo nuo 1,14 iki 1,21 karto, palyginus su kontrole.

Tyrimai parodė, kad toliau kultivuoiant kompleksus (16 parų) ligninas degradavo lėtai. Labiau (iki 12,32) šis komponentas degradavo po mikromicetų *Galactomyces geotrichum-Myrothecium verrucaria* kultivavimo. Tai buvo 1,3 karto mažiau, palyginus su kontrole. Peroksidazinis komplekso aktyvumas buvo 59,7 a.v./g, tirozinazinis – 1,12 sąl.v./g ir mažas lakazinis (ekst. koef. 0,005). Mikromicetų komplekso *Galactomyces geotrichum-Sporotrichum pruinosum* kultivavimas 16 parų lignino kiekio beveik nepakeitė, palyginus su jo kultivavimu 12 parų. Šiek tiek labiau ligninas degradavo dėl mikromicetų komplekso *Dipodascus armillariae-Verticillium fungicola* kultivavimo. Lignino kiekis sumažėjo 1,25 karto, palyginus su kontrole. Peroksidazinis ir tirozinazinis šių kompleksų aktyvumas nepasireiškė, o lakazinis aktyvumas – ekst. koef. 0,141. Dėl kitų mikromicetų kompleksų kultivavimo šis komponentas labai mažai te degradavo.

Kultivuoiant mikromicetų kompleksus ilgiau (20 parų), lignino degradacijos laipsnis mažai pakito. Dėl visų mikromicetų kompleksų įtakos lignino degradacija tesudarė nuo 1,23 iki 1,4 karto mažiau, palyginus su kontrole.

Tokiu būdu daroma išvada, kad lignino degradacija pirmose pavienių mikromicetų ir jų kompleksų kultivavimo stadijose (per 20 parų) vyksta lėtai. Tai patvirtina ir kitų autorių atliktų tyrimų duomenys (Бабицкая и др., 1990; Бабицкая 1994). Nurodoma, kad gilesnį lignino polimero demetoksilinimą, jungčių  $\beta$ -O-4 nutraukimą iki mono- ir dimerinių junginių, aromatinių žiedų ardymą pradinėse micelinių grybų kultivavimo stadijose atlieka makromicetai. Mikromiceto *Penicillium verrucosum* įtaka lignino degradacijai pradinėse mikromicetų kultivavimo stadijose apsiribojo tiktai funkcinių grupių atėmimu, o iš esmės lignino molekulės nepakeitė. Tai aiškinama tuo, kad pradinėse kultivavimo stadijose grybai C šaltiniu panaudoja laisvus angliavandenius ir lengvai pasisavinamus augalų polimerų polisacharidus, tik nežymiai paliesdami ligniną.

Anksčiau atliktieji tyrimai (Raudonienė, Varnaitė, 1998; Varnaitė, 1999) parodė, kad ligninas sparčiau degradoja vėlesnėse mikromicetų ir jų kompleksų kultivavimo stadijose. Kultivuojant kompleksą *Galactomyces geotrichum*–*Myrothecium verrucaria* 60 parų, lignino kiekis sumažėjo 2,4 karto, o kompleksą *Sporotrichum pruinosum*–*Galactomyces geotrichum* – 1,9 karto, palyginus su kontrole.

Spartų lignino irimą vėlesnėse lignino ir celiuliozės komplekso degradacijos stadijose patvirtina ir kitų autorių duomenys (Irbe et al., 2001).

Paieška būdų, paspartinančių lignino degradaciją augalų atliekose mikromicetais, lieka aktuali Respublikos pašarų gamintojams, siekiant sukurti biotechnologinius metodus baltymingai biomasei gauti.

Gauta  
2003 06 18

#### Literatūra

- Blanchette R. A. A review of microbiological deterioration found in archeological wood from different environments. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2000. Vol. 46. P. 189–204.
- Hammel K. E. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 1989. N 11. P. 776–777.
- Irbe I., Andersone I., Andersone B., Chirkova J. Use <sup>13</sup>C NMR, sorption and chemical analyses for characteristics of brown-rotted Scots pine. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2001. Vol. 47. P. 37–45.
- Ravin H., Harward M. Rapid test for hepatolenticular degeneration. *The lancet*. 1965. Vol. 270. N 6920. P. 726–727.
- Raudonienė V., Varnaitė R. Degradation of lignin-cellulose complex of plant remnants by fungi. *Biologija*. 1998. Nr. 4. P. 52–55.
- Score A. J., Palfreyman W., Nia A. White. Extracellular Phenoloxidase and Peroxidase Enzyme Production during Interspecific Fungal Interactions. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 1997. Vol. 39. N 2, 3. P. 225–233.
- Varnaitė R. Bioconversion of plant remnants by complexes of fungi. *Biologija*. 1999. Nr. 2. P. 44–48.
- Бабицкая В. Г., Щерба В. В., Осадчая О. В., Латышева С. Г. Деградация лигнина соломы ржи и костры льна под действием мицелиальных грибов. *Химия древесины*. 1990. № 6. С. 83–88.
- Бабицкая В. Г. Ферментативная деградация лигнина, содержащегося в растительных субстратах, мицелиальными грибами. *Прикладная биохимия и микробиология*. 1994. Т. 30. Вып. 6. С. 827–833.
- Билай В. И. *Методы экспериментальной микологии*. Киев, 1982.
- Головлева Л. А., Гамбаров Х. Г., Скрыбин Г. К. Разложение лигнина грибными культурами. *Микробиология*. 1982. № 51. С. 543–547.
- Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. *Методы биохимического исследования растений*. Ленинград, 1987.
- Худякова Х. К. Определение содержания лигнина в кормах и кормовых растениях. *Сельскохозяйственная биология*. 1984. № 8. С. 120–124.

#### Regina Varnaitė

#### LIGNIN DEGRADATION IN RYE STRAW IN THE FIRST STAGES OF MICROMYCETE CULTIVATION

#### S u m m a r y

The extent of lignin degradation in rye straw during the initial cultivation stages of individual micromycetes or their complexes was investigated and fungal phenoloxidase activity was evaluated.

It was established that during 16–20 days of cultivation of individual micromycetes *Galactomyces geotrichum* decreased lignin amount more rapidly than the other cultivated micromycetes (respectively 1.53 and 1.56 times in comparison with the control).

During this period, peroxidase activity was 3.93 a.u./g, tirosinase 0.025 c.u./g, and the laccase ext. coef. was 0.02.

The least changes in lignin amount (12.5%) were established after cultivation of the micromycete *Myrothecium verrucaria*. Peroxidase (5.36 a.u./g) and tirosinase (0.324 c.u./g) activities of this micromycete were higher than the phenoloxidase activity of *Galactomyces geotrichum*.

The investigation showed that lignin degradation in rye straw was very slow in the first cultivation stages of micromycete complexes. The complex *Galactomyces geotrichum*–*Sporotrichum pruinosum* decreased lignin amount more evidently (to 11.3%). It was 1.43 times less than in control. Peroxidase activity of this complex was 31.87 a.u./g, tirosinase 0.87 c.u./g, and laccase activity was not detected. Lignin degradation (up to 12.18%), in comparison with other micromycete complexes, was more significant after cultivation of *Galactomyces geotrichum*–*Myrothecium verrucaria* for 20 days. Peroxidase activity of this complex was 129.9 a.u./g, tirosinase 1.416 c.u./g., and laccase ext. coef. was 0.01.

**Key words:** micromycetes, micromycete complexes, lignin, phenoloxidases: peroxidase, laccase, tirosinase