

МРНТИ: 62.01.91

А.Б. АЛТЕКЕЙ^{1*}, А.А. САПАРБЕКОВА¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА²,
А.А. СЕЙТМАГЗИМОВ¹, А.Ш. МАМБАЕВА³

¹Южно-Казахстанский университет им. М. Ауезова, Шымкент, Казахстан

²Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

³Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан

*e-mail: altekey@mail.ru

БИОДЕГРАДАЦИЯ ЛИГНИНА СОЛОМЫ КУЛЬТУРОЙ ГРИБА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE*, ВЫДЕЛЕННОЙ С ПОВЕРХНОСТИ ДЕРЕВА

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.08

Аннотация

Одной из глобальных проблем, с которой человечество столкнулось в последнее столетие, является загрязнение окружающей среды. Большая часть токсичных выбросов приходится на различные виды производств, одним из которых является целлюлозно-бумажное. Традиционное целлюлозно-бумажное производство подразумевает использование щелочей и кислот, попадающих впоследствии в окружающую среду со сточными водами вместе с трудноразлагаемым лигнином. С учетом повышения спроса на целлюлозно-бумажные расходные материалы разработка новых экологично-безопасных технологий для целлюлозно-бумажной промышленности становится крайне актуальной. Одним из предложенных способов решения проблемы является биологический метод предварительной обработки сырья при целлюлозно-бумажном производстве.

На стадии предварительной обработки сырья химическим способом происходит разрыв ковалентных связей между целлюлозой и лигнином, биологический же способ подразумевает биодеструкцию целлюлозно-лигнинных связей, с использованием ферментов, синтезируемых микроорганизмами.

В данной статье описана работа, в ходе которой была выделена чистая культура гриба *Schizophyllum commune*, с поверхности коры частично разрушенного дерева, способный, синтезировать необходимые ферменты для разложения древесины. Постановка эксперимента дала Данные полученные в ходе эксперимента дали оптимистичные прогнозы о возможности замены традиционного способа предварительной обработки сырья на микробиологический, так как под действием ферментов, синтезируемых грибом *S. commune*, количество лигнина в соломе снизилось практически в два раза с 17,61% до 9,09%.

Ключевые слова: биодеградация, лигнин, древесина, чистая культура, субстрат.

В связи с наличием больших посевных площадей злаковых культур, потенциально перспективным направлением для Казахстана является исследование возможности использования соломы в качестве сырья для целлюлозно-бумажной промышленности [1, 2]. Пшеничная солома может служить ресурсным альтернативным сырьем для целлюлозно-бумажного производства, особенно для производства специальных и функциональных сортов бумаги, таких как фильтровальная бумага. Солома на 15% состоит из лигнина, на 35-45% - из целлюлозы, оставшиеся 20-30% приходятся на гемицеллюлозу [3, 4]. Благодаря своей рыхлой текстуре она легко подвергается воздействию реагентов во время предварительной обработки. Однако проблема отделения лигнина от целлюлозы до сих пор полностью не решена. Лигнин является одним из составляющих компонентов растительной клетки, по значимости занимающий третье место после целлюлозы и гемицеллюлозы. Суммарно все три компонента обеспечивают прочность клеточной стенки. Помимо всего, за лигнином закреплены такие функции как прохождение воды по сосудистым тканям, антимикробный барьер и защита полисахаридов (целлюлозы и гемицеллюлозы) от гидролиза вследствие действия микробных ферментов [5, 6]. Сложность отделения лигнина от целлюлозы заключается в образовании ковалентной связи между ними и наличии

различных функциональных групп в лигнине, таких как гидроксильные, метоксильные, карбоксильные и карбонильные. Соотношение вышеуказанных групп зависит от источника лигнина [7]. Сухая масса клеточной стенки на 20-35% состоит из лигнина, в зависимости от растения, мягкая древесина - на 25-35%, а лиственная древесина - на 20-25% [8].

Такие физико-химические и механические методы предварительной обработки как кислотная, щелочная и применение парового взрыва не являются предпочтительными по нескольким причинам: изменение структуры лигнина, токсические выбросы, большие финансовые расходы [9, 10]. Можно сказать, что биологический метод разложения лигнина является альтернативным методом предварительной обработки древесного и недревесного сырья благодаря экологической безопасности и экономической выгоды. В качестве агентов процесса биоразложения лигнина чаще всего используют грибы, а именно грибы белой гнили. Механизм действия микроорганизмов на сырье заключается в атаке лигнина и его разложении, что приводит к размягчению сырья. Группа микроорганизмов, разлагающих лигнин, продуцирует необходимые для этого ферменты: лигнинпероксидазу, лакказу и марганцевую пероксидазу [11].

В настоящем исследовании в целях биodeградации лигнина соломы был отобран гриб *Schizophyllum commune* с древесины растущего дерева (рисунок 1). Использование данного гриба обусловлено наличием его лигнинолитической активности, способности синтезировать лигнинпероксидазу, лакказу и марганцевую пероксидазу [12, 13].



Рисунок 1 – Гриб *Schizophyllum commune*

Объекты и методы исследования

Выделение чистой культуры гриба *S. commune*

Образец гриба был отобран с поверхности дерева в стерильный пакет, на следующий день в стерильных условиях перенесен на твердую питательную среду Сабуро и термостатирован при 25°C на пять суток. Полученный мицелий, свойственный грибу *S. commune*, был пересеян пятикратно до получения однородного роста, свидетельствующем о чистоте культуры. Инокулят получали путем смыва культуры *S. commune* с поверхности питательной среды Сабуро 0,9% раствором натрия хлорида.

Биodeградация лигнина соломы

В эксперименте использовали питательную среду, приготовленную на основе соломы. В коническую колбу Эрленмейера помещали 10 г соломы, измельченной с помощью мельницы ЛК200 до размера частиц 45 мкм, добавляли 0,01 г глюкозы, 5 мл 0,0004% раствора твина и стерилизовали в автоклаве на протяжении 15 мин при 121°C. Затем в асептических условиях добавляли 5 мл инокулята культуры *S. commune* и термостатировали при 25°C. Пробы на анализ отбирали каждые 5 дней.

Анализ образцов

Анализ остаточного лигнина проводили каждые 5 суток на протяжении 4-х недель. В колбу Эрленмейера высыпали 1 г (а) инокулированного препарата, добавляли 150 мл дистиллированной воды и доводили до 90-100°C на протяжении 1 часа, отфильтровывали, раствор промывали 300 мл горячей дистиллированной воды, высушивали до постоянного веса. Сухой осадок добавляли в колбу со 150 мл 1N H₂SO₄ и доводили до 90-100°C на протяжении 1 часа, отфильтровывали, раствор промывали 300 мл горячей дистиллированной воды, высушивали до постоянного веса (с). Полученный сухой осадок добавляли в колбу с 72% H₂SO₄ и оставляли на 4 часа при комнатной температуре. Спустя 4 часа в смесь добавляли 150 мл 1N H₂SO₄ и доводили до 90-100°C на протяжении 1 часа, отфильтровывали, раствор промывали 400 мл дистиллированной воды, высушивали в сушильном шкафу при 105°C до постоянной массы (d). Затем этот же осадок высушивали до состояния пепла и взвешивали (е).

Расчет выполняли по следующей формуле:

$$\% \text{ целлюлозы} = \frac{c-d}{a} \times 100\%,$$

$$\% \text{ лигнина} = \frac{d-e}{a} \times 100\%,$$

где: а - вес образца,

с – вес массы при втором взвешивании,

d - вес массы при третьем взвешивании,

е – вес пепла.

Результаты и обсуждение

Первым этапом работы было выделение чистой культуры *S. commune* (рисунок 2) и приготовление инокулята.

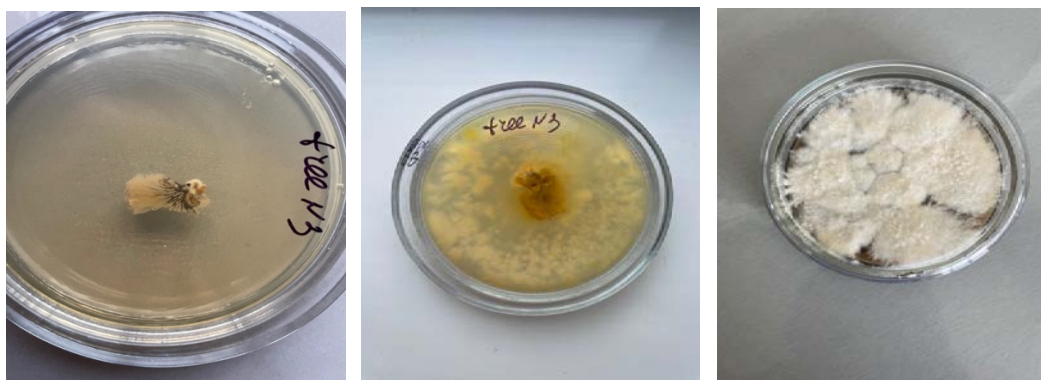


Рисунок 2 – Выделение чистой культуры гриба *S. commune*

Следующим этапом было культивирование гриба на субстрате с соломой, измельченной до 45 мкм, на протяжении 20 суток при температуре 25°C. Процесс биодegradации лигнина соломы предоставлен в виде схемы на рисунке 3.

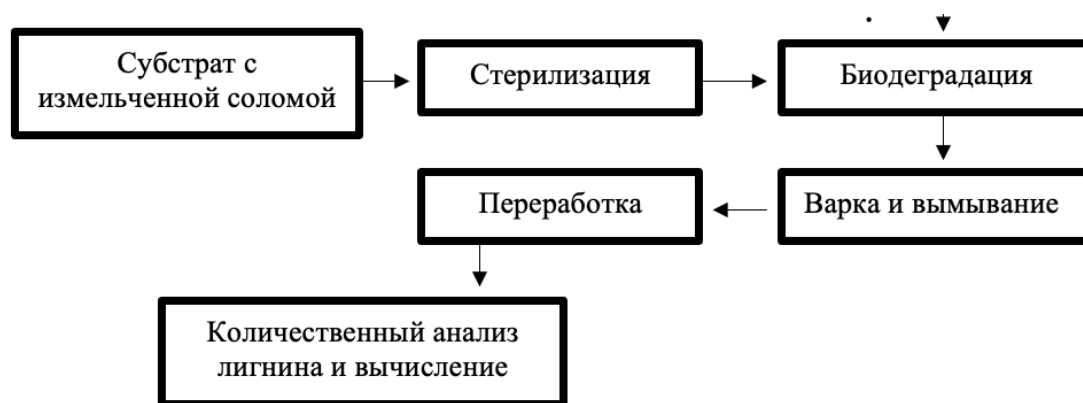
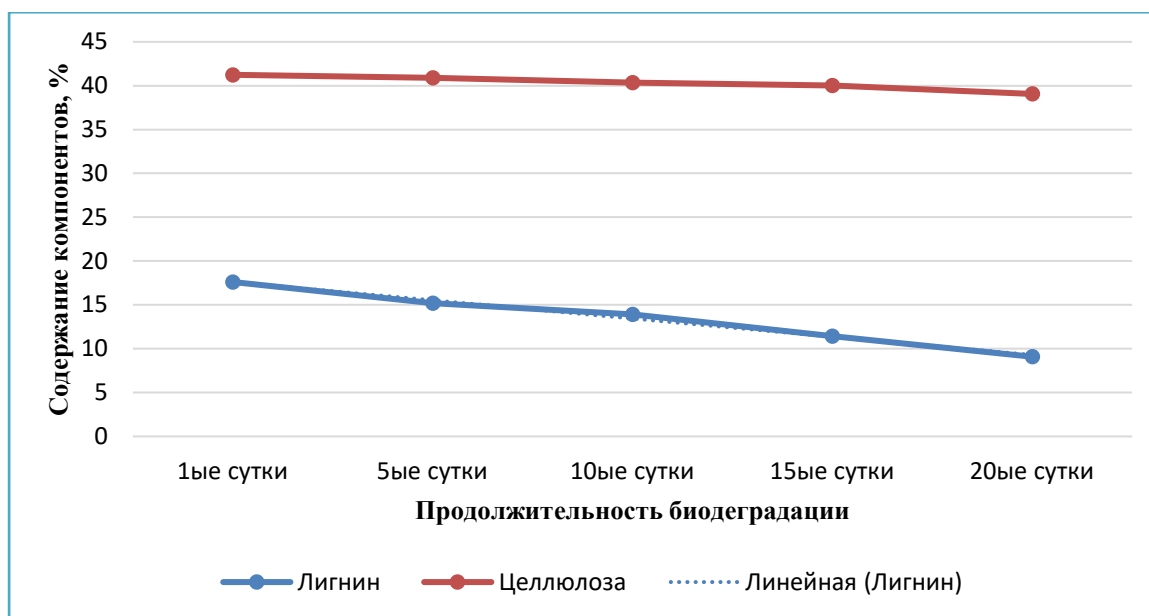


Рисунок 3 – Схема биодеградации лигнина соломы

Образцы отбирали каждые 5 дней и анализировали на количество остаточного лигнина и целлюлозы. Результаты иллюстрированы на рисунке 4 и представлены в таблице 1.

Рисунок 4 - Мониторинг количества лигнина и целлюлозы соломы в ходе биодеградации культурой *S. commune* на протяжении 20 днейТаблица 1 - Мониторинг количества лигнина и целлюлозы соломы в ходе биодеградации культурой *S. commune* на протяжении 20 дней

Время культивирования, сутки	Содержание лигнина, %	Содержание целлюлозы, %
1	17,61	41,24
5	15,19	40,88
10	13,91	40,34
15	11,43	40,02
20	9,09	39,06

На основании данных, представленных в таблице 1, можно сделать вывод о том, что биодеградация лигнина соломы культурой *S. commune* возможна; причём благодаря добавлению избыточного количества источника углевода в виде раствора глюкозы, целлюлоза остается практически нетронутой.

Помимо количественных методов анализа на остаточное количество лигнина были сделаны снимки на растровом электронном микроскопе для оценки изменения структуры соломы до биодegradации (рисунок 5а) и после процесса биодegradации (рисунок 5б).

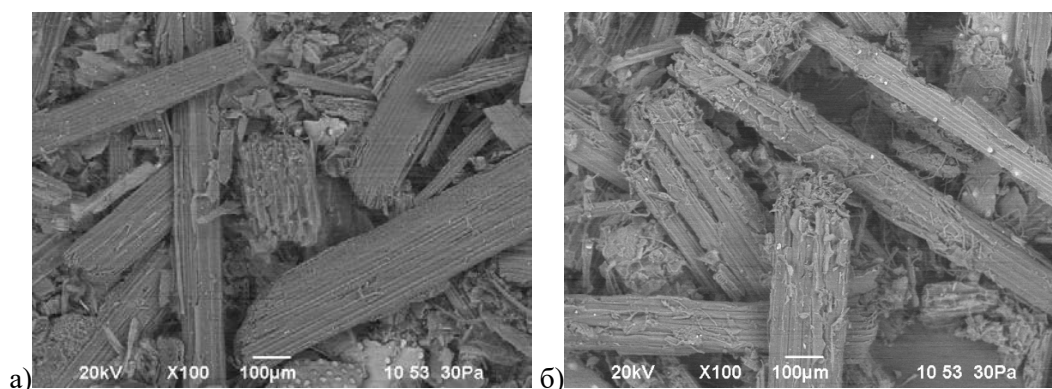


Рисунок 5 – Изменение структуры соломы: а) до биодegradации, б) после биодegradации

На снимках видны изменения в структуре соломы. Если до процесса биодegradации грибом *S. commune* солома имела однородную целостную структуру, то после биодegradации структура соломы стала рыхлой, неоднородной, некоторые участки разделились на более мелкие частицы, что позволяет сделать вывод о том, что данный древоразрушающий грибок способен расщеплять лигнин-целлюлозные связи в соломе.

Таким образом установлено, что в контрольном образце содержание лигнина составляло 17,61% от массы, к концу дegradации, на 20-й день - 9,09%, что практически в два раза меньше изначального количества. Также на положительные показатели биодegradации лигнина повлиял размер помола соломы - до 45 мкм. Полученные результаты оптимистичны, так как в схожей научной работе с данной культурой микроорганизма авторам удалось добиться дegradации лигнина соломы лишь на 21% [14]. Соответственно можно сделать вывод, что данный способ использования культуры *S. commune* при целлюлозно-бумажном производстве и переработке отходов сельского хозяйства актуален и перспективен.

Заклучение

Предоставленные результаты данной работы служат доказательством биоразлагаемости лигнина соломы культурой древоразрушающего гриба *S. commune*. Согласно проведенным исследованиям, на 20-е сутки культивирования гриба при 25°C на измельченной до 45 мкм соломе с добавлением глюкозы, количество лигнина снизилось с 17,61% до 0,09%. Биодegradация лигнина в целом может заменить механические и химические методы предварительной обработки сырья при целлюлозно-бумажном производстве, что значительно сократит расходы на дорогостоящие реактивы и снизит количество вредных промышленных выбросов в окружающую среду.

Литература:

- 1 Abd-Elsalam H.E., El-Hanafy A.A. Lignin biodegradation with ligninolytic bacterial strain and comparison of *Bacillus subtilis* and *Bacillus* sp. isolated from Egyptian soil. In: *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 2009: Vol. 5, Issue 1. P. 39-44.
- 2 Atiweh G., Parrish C.C., Banoub J., Le T.T. Lignin degradation by microorganisms: A review. In: *Biotechnol. Prog.*, 2022: Vol. 38, Issue 2. (doi.org/10.1002/btpr.3226).
- 3 Beisl S., Friedl A., Miltner A. Lignin from Micro- to Nanosize: Applications. In: *Int. J. Mol. Sci.*, 2017: Vol. 18, Issue 11. Art. ID 2367. (doi.org/10.3390/ijms18112367).
- 4 Chang A.J., Fan J., Wen X. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw. In: *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2012: Vol. 72. P. 26-30.

- 5 Christopher L.P., Yao B., Ji Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. In: *Front. Energy Res.*, 2014: Vol. 2. (doi.org/10.3389/fenrg.2014.00012)
- 6 Khan M.U., Ahring B.K. Anaerobic biodegradation of wheat straw lignin: The influence of wet explosion pretreatment. In: *Energies.*, 2021: Vol. 14, Issue 18. Art. ID. 5940. (doi.org/10.3390/en14185940)
- 7 Małachowska E., Dubowik M., Boruszewski P., Łojewska J., Przybysz P. Influence of lignin content in cellulose pulp on paper durability. In: *Sci. Rep.*, 2020: Vol. 10, Issue 1. Art. ID 19998. (doi.org/10.1038/s41598-020-77101-2)
- 8 Malik S., Rana V., Joshi G., Gupta P.K., Sharma A. Valorization of wheat straw for the paper industry: Pre-extraction of reducing sugars and its effect on pulping and papermaking properties. In: *ACS Omega*, 2020: Vol. 5, Issue 47. P. 30704–30715. (doi.org/10.1021/acsomega.0c04883)
- 9 Muhammad Irshad. Production and optimization of ligninolytic enzymes by white rot fungus *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid state medium banana stalks. In: *Afr. J. Biotechnol.*, 2011: Vol. 10, Issue 79. (doi.org/10.5897/AJB11.2242)
- 10 Ververis C., Georghiou K., Danielidis D., Hatzinikolaou D.G., Santas P., Santas R., Corleti V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. In: *Bioresour. Technol.*, 2007: Vol. 98, Issue 2. P. 296–301. (doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.007)
- 11 Wang Lei, Wang Wangui, Ji Xiang, Cai Lu. Biodegradation of lignin by the white rot fungus *Polyporus varius* and its promising potential for biopulping. In: *Renew. Energy Environ.: Int. Conf. Mater.* -Shanghai, 2011: P. 464–468.
- 12 Xiong Y., Zhao Y., Ni K., Shi Y., Xu Q. Characterization of ligninolytic bacteria and analysis of alkali-lignin biodegradation products. In: *Pol. J. Microbiol.*, 2020: Vol. 69, Issue 3. P. 339–347. (doi.org/10.33073/pjm-2020-037)
- 13 Xu G., Wang X., Hu J. Biobleaching of wheat straw pulp using laccase and xylanase. In: *BioResources*, 2013: Vol. 8, Issue 3. P. 3181–3188.
- 14 Kumar V. P., Sridhar M., Rao R. G. Biological depolymerization of lignin using laccase harvested from the autochthonous fungus *Schizophyllum commune* employing various production methods and its efficacy in augmenting in vitro digestibility in ruminants. In: *Scientific Reports*, 2022. Vol. 1, Issue 12. Art. ID 11170. (doi.org/10.1038/s41598-022-15211-9).

А.Б. АЛТЕКЕЙ^{1*}, А.А. САПАРБЕКОВА¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА²
А.А. СЕЙТМАГЗИМОВ¹, А.Ш. МАМБАЕВА³

¹М.Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан университеті, Шымкент, Қазақстан

²Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталағы, Алматы, Қазақстан

³Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: altekey@mail.ru

АҒАШ БЕТІНЕН ОҚШАУЛАНҒАН *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* САҢЫРАУҚҰЛАҒЫНЫҢ ДАҚЫЛЫМЕН САБАН ЛИГНИНІНІҢ БИОДЕГРАДАЦИЯСЫ

Түйін

Өткен ғасырда адамзат бетпе-бет келген жаһандық мәселелердің бірі – қоршаған ортаның ластануы. Ұлы шығарындылардың көпшілігі әртүрлі өндіріс түрлерінен келеді, олардың бірі целлюлоза мен қағаз. Дәстүрлі целлюлоза және қағаз өндірісі сілтілерді, қышқылдарды пайдалануды қамтиды, нәтижесінде олар ағынды сулармен және әрең ыдырайтын лигнинмен қоршаған ортаға қосылады. Кеңсе тауарларына, бір рет қолданылатын целлюлоза орамалдарына және қағаз орауыш материалдарына жыл сайынғы сұраныс тек қана өсіп келе жатқанын ескерген жөн, бұл целлюлоза-қағаз өнеркәсібі үшін жаңа экологиялық таза технологияларды дамытуға сұранысты арттырады. Мәселені шешудің ұсынылған жолдарының бірі – целлюлоза-қағаз өндірісінде шикізатты алдын ала өңдеудің биологиялық әдісі.

Шикізатты алдын ала өңдеу сатысында целлюлоза мен лигнин арасындағы коваленттік байланыстар үзіледі, бұл үшін дәстүрлі түрде сілтілер мен қышқылдар қолданылады, ал биологиялық әдіс микроорганизмдер синтездейтін ферменттердің көмегімен целлюлоза-лигнин байланыстарын биодеструкциялауды қамтиды.

Бұл жұмыста ағаштың (зақымдалған немесе жергілікті ыдырайтын) қабығының бетінен ағаштың ыдырауына қажетті ферменттерді синтездейтін *Schizophyllum commune* саңырауқұлақты таңдадық. Тәжірибе орнату шикізатты алдын ала өңдеудің дәстүрлі әдісін микробиологиялық әдіспен ауыстыру мүмкіндігі туралы оптимистік болжамдар берді, өйткені *S. commune* саңырауқұлағы синтездеген ферменттердің әсерінен сабандағы лигнин мөлшері екі есеге дерлік азайды. 17,61%-дан 9,09%-ға дейін.

Кілтті сөздер: биодеградация, лигнин, ағаш, таза дақыл, субстрат.

IRSTI: 62.01.91

A.B. ALTEKEY^{1*}, A.A. SAPARBEKOVA¹, Y.A. OLENIKOVA²,
A.A. SEITMAGZIMOV¹, A.Sh. MAMBAYEVA³

¹South Kazakhstan University named after M. Auezov, Shymkent, Kazakhstan

²Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

³ Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: altekey@mail.ru

BIODEGRADATION OF STRAW LIGNIN BY CULTURE OF THE FUNGUS *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* ISOLATED FROM THE TREE SURFACE

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.08

Abstract

One of the global problems that mankind has faced in the last century is environmental pollution. Most of the toxic emissions come from various types of production, one of which is pulp and paper. Traditional pulp and paper production involves the use of alkalis and acids, subsequently released into the environment with wastewater along with hardly decomposable lignin. Given the increasing demand for pulp and paper consumables, the development of new environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry is becoming extremely relevant. One of the proposed ways to solve the problem is the biological method of pre-treatment of raw materials in pulp and paper production.

At the stage of pre-treatment of raw materials by a chemical method, the covalent bonds between cellulose and lignin are broken, while the biological method involves the biodestruction of cellulose-lignin bonds using enzymes synthesized by microorganisms.

In this work, we selected a fungus *Schizophyllum commune* that synthesized the necessary enzymes for wood decomposition from the surface of a partly decomposed tree bark. The setting of the experiment gave optimistic predictions about the possibility of replacing the traditional method of pre-treatment of raw materials with a microbiological one, since under the action of enzymes synthesized by the fungus *S. commune*, the amount of lignin in the straw almost halved from 17.61% to 9.09%.

Keywords: biodegradation, lignin, wood, pure culture, substrate.

With the rapid development of various manufacturing industries and great attention to the environmental situation, scientists are increasingly turning to biotechnology in order to find alternative natural solutions. So, for example, due to the lack of forest plantations in Kazakhstan, and the presence of large sown areas of cereal crops, a potentially promising direction for the republic is to study the possibility of using straw as a raw material for the pulp and paper industry [1, 2].

Wheat straw is a resource alternative raw material for pulp and paper production, especially for the production of specialty and functional grades of paper, such as filter paper. Straw consists of 15% lignin, 35-45% cellulose, the remaining 20-30% is hemicellulose [3, 4]. Due to its loose texture, it is easily attacked by reagents during pre-treatment. However, the problem of separating lignin from cellulose has not yet been completely solved. Lignin is one of the constituent components of the plant cell in importance, ranking third after cellulose and hemicellulose. In total, all three components provide the strength of the cell wall. In addition to everything, lignin has such functions as: the passage of water through vascular tissues, an antimicrobial barrier and the protection of polysaccharides (cellulose and hemicellulose) from hydrolysis as a result of the action of microbial enzymes. [5, 6]. The complexity of separating lignin from cellulose lies in the formation of a covalent bond between them and the presence of various functional groups in lignin, such as: hydroxyl, methoxy, carboxyl and carbonyl. The ratio of the above groups depends on the source of lignin [7]. The dry mass of the cell wall is 20-35% lignin, depending on the plant, soft wood is 25-35%, and hardwood 20-25% [8].

Such physico-chemical and mechanical pre-treatment methods such as: acid, alkali and steam explosion are not preferred for several reasons: a) the structure of lignin changes; b) toxic emissions; c) high financial costs [9, 10]. It can be said that the biological method of lignin decomposition is an alternative method of pre-treatment of wood and non-wood raw materials due to environmental safety and economic benefits. As agents of the process of biodegradation of lignin, fungi are most often used, namely white rot fungi. The mechanism of action of microorganisms on raw materials is the attack of lignin and its decomposition, which leads to softening of raw materials. A group of microorganisms that decompose lignin produce the enzymes necessary for this (lignin peroxidase (LiP), laccase (Lac) and manganese peroxidase (MnP)) [11]

Schizophyllum commune was selected for the biodegradation of straw lignin from the wood of a growing tree (figure 1). The use of this particular fungus is due to its ligninolytic activity, and ability to synthesize lignin peroxidase, laccase, and manganese peroxidase [12, 13].



Figure 1 - Mushroom *Schizophyllum commune*

Materials and methods of research

Isolation of a pure culture of the fungus S. commune

A sample of the fungus was taken from the surface of the tree in a sterile bag, the next day under sterile conditions it was transferred to a Sabouraud's solid nutrient medium and thermostated for 25°C for five days. The resulting mycelium characteristic of the fungus *S. commune* was subcultured five times until uniform growth was obtained, indicating the purity of the culture. The inoculum was obtained by washing the culture of *S. commune* from the surface of Sabouraud culture medium with 0.9% sodium chloride solution.

Biodegradation of straw lignin

In the experiment, a nutrient medium prepared on the basis of straw was used. 10 g of straw crushed with a mill LK200 to a particle size of 45 µm was placed in a conical Erlenmeyer flask. Then 0.01 g of glucose and 5 ml of tween 0.0004% solution was added and the medium was sterilized in an autoclave for 15 minutes at 121° C, then 5 ml of *S. commune* culture inoculum was added under aseptic conditions and thermostated at 25°C. Samples for analysis were taken every 5 days .

Sample analysis

Residual lignin analysis was performed every 5 days for 4 weeks. 1 g (a) of the inoculated preparation was poured into an Erlenmeyer flask, 150 ml of distilled water was added and brought to 90-100°C for 1 hour, the solution was filtered, washed with 300 ml of hot distilled water, and dried to constant weight. The dry precipitate was added to a flask with 150 ml of 1N H₂ SO₄ and brought to 90-100°C for 1 hour and filtered, the solution was washed with 300 ml of hot distilled water, dried to constant weight (s). The resulting dry precipitate was added to a flask with 72% H₂ SO₄ and left for 4 hours at room temperature. After 4 hours, 150 ml of 1N H₂ SO₄ and brought to 90-100°C for 1 hour and the solution was filtered, washed with 400 ml of distilled water, dried in an oven at 105°C to constant weight (d). Then the same precipitate was dried to ash and weighed (e).

The calculation was performed according to the following formula:

$$\% \text{ cellulose} = \frac{c-d}{a} \times 100\%,$$

$$\% \text{ lignin} = \frac{d-e}{a} \times 100\%,$$

where: a is the weight of the sample,

c - weight of the mass at the second weighing,

d - weight of the mass at the third weighing,

e is the weight of the ash.

Results and discussion

The first stage of the work was the isolation of a pure culture of *S. commune* (figure 2), and inoculum preparation.

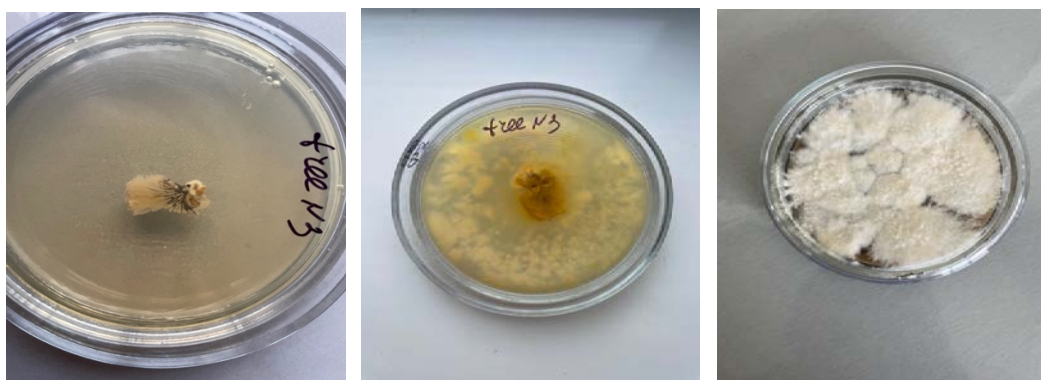


Figure 2 - Isolation of a pure culture of the fungus *S. commune*

The next step was the cultivation of the fungus on a substrate with straw crushed to 45 microns for 20 days at a temperature of 25°C. The process of biodegradation of straw lignin is presented in the form of a diagram in figure 3.

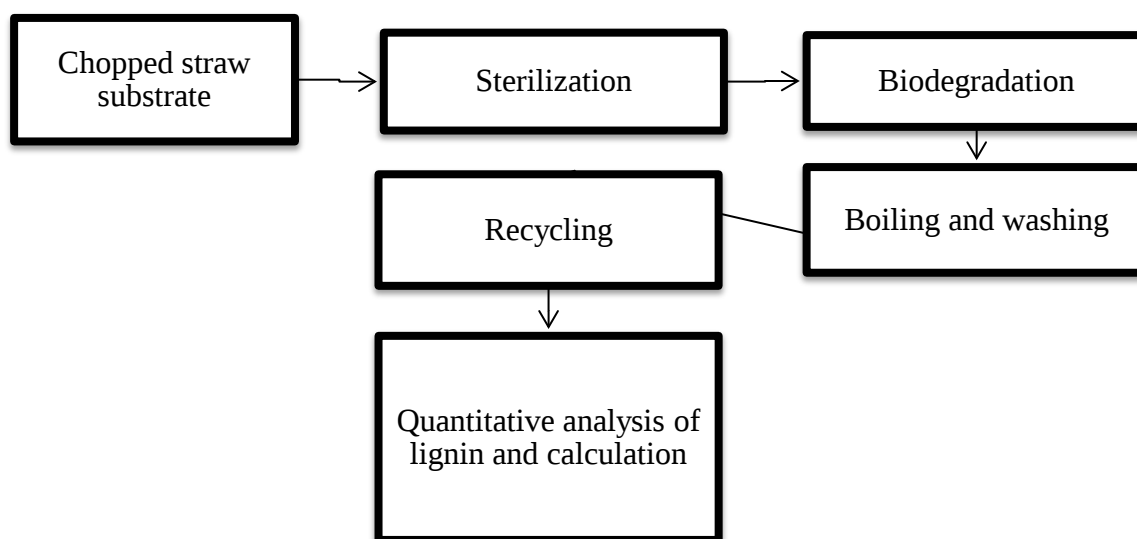
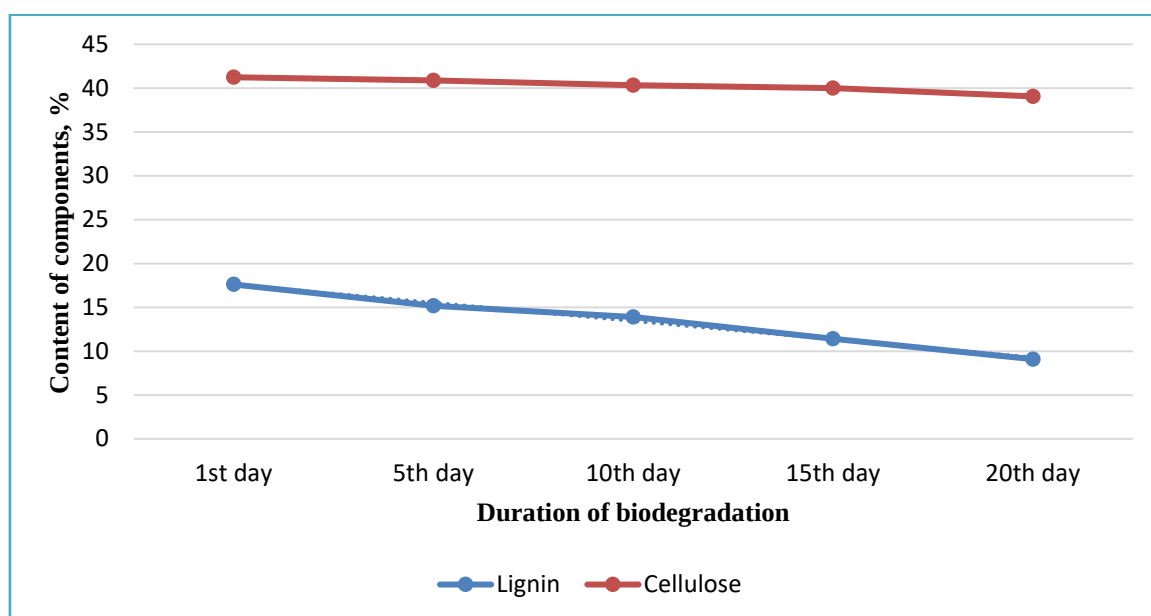


Figure 3 - Scheme of biodegradation of straw lignin

Samples were taken every 5 days and analyzed for residual lignin and cellulose. The results are illustrated in figure 4 and presented in table 1.

Figure 4 - Monitoring the amount of lignin and cellulose of straw during biodegradation by *S. commune* culture for 20 daysTable 1 - Monitoring of the amount of lignin and cellulose of straw during biodegradation by *S. commune* culture for 20 days

Cultivation time, days	Lignin content, %	Cellulose content, %
1	17.61	41.24
5	15.19	40.88
10	13.91	40.34
15	11.43	40.02
20	9.09	39.06

Studying table 1, we can conclude that the biodegradation of straw lignin by *S. commune* culture is possible, while due to the addition of an excess source of carbohydrate in the form of a glucose solution, the cellulose remains practically untouched.

In addition to quantitative methods of analysis for the residual amount of lignin, images were taken on a scanning electron microscope to assess the change in the structure of the straw before biodegradation (figure 5a) and after the biodegradation process (figure 5b).

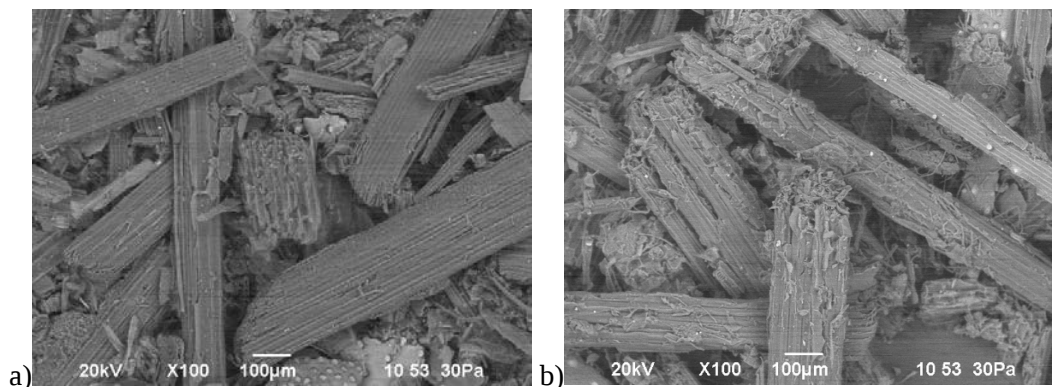


Figure 5 - Change in the structure of straw chips a) before biodegradation, b) after biodegradation

The figures show changes in the structure of the straw. If before the process of biodegradation by the *S. commune* fungus, the straw had a homogeneous integral structure, then after biodegradation, the structure of the straw became loose, heterogeneous, some sections were divided into smaller particles, which allows us to conclude that this wood-destroying fungus is able to break down lignin-cellulose bonds in straw.

Thus, it was found that in the control sample the lignin content was 17.61% by weight, by the end of degradation, on the 20th day - 9.09%, which is almost two times less than the initial amount. Also, the size of straw grinding - up to 45 microns - influenced the positive indicators of lignin biodegradation. The results obtained are optimistic, since in a similar scientific work with this microorganism culture, the authors managed to achieve straw lignin degradation by only 21% [14]. Accordingly, it can be concluded that this method of using the culture of *S. commune* in the pulp and paper production and processing of agricultural waste is relevant and promising.

Conclusion

The presented results of this work serve as evidence of the biodegradability of straw lignin by the culture of the wood-destroying fungus *S. commune*. According to the studies, on the 20th day of cultivation of the fungus at 25°C on straw crushed to 45 microns with the addition of glucose, the amount of lignin decreased from 17.61% to 0.09%. The biodegradation of lignin can generally replace the mechanical and chemical methods of pre-treatment of raw materials in pulp and paper production, which will significantly reduce the cost of expensive reagents and reduce the amount of harmful industrial emissions into the environment.

References:

- 1 Abd-Elsalam H.E., El-Hanafy A.A. Lignin biodegradation with ligninolytic bacterial strain and comparison of *Bacillus subtilis* and *Bacillus* sp. isolated from Egyptian soil. In: *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 2009: Vol. 5, Issue 1. P. 39-44.
- 2 Atiweh G., Parrish C.C., Banoub J., Le T.T. Lignin degradation by microorganisms: A review. In: *Biotechnol. Prog.*, 2022: Vol. 38, Issue 2. (doi.org/10.1002/btpr.3226).
- 3 Beisl S., Friedl A., Miltner A. Lignin from Micro- to Nanosize: Applications. In: *Int. J. Mol. Sci.*, 2017: Vol. 18, Issue 11. Art. ID 2367. (doi.org/10.3390/ijms18112367).
- 4 Chang A.J., Fan J., Wen X. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw. In: *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2012: Vol. 72. P. 26-30.

- 5 Christopher L.P., Yao B., Ji Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. In: *Front. Energy Res.*, 2014: Vol. 2. (doi.org/10.3389/fenrg.2014.00012)
- 6 Khan M.U., Ahring B.K. Anaerobic biodegradation of wheat straw lignin: The influence of wet explosion pretreatment. In: *Energies.*, 2021: Vol. 14, Issue 18. Art. ID. 5940. (doi.org/10.3390/en14185940)
- 7 Małachowska E., Dubowik M., Boruszewski P., Łojewska J., Przybysz P. Influence of lignin content in cellulose pulp on paper durability. In: *Sci. Rep.*, 2020: Vol. 10, Issue 1. Art. ID 19998. (doi.org/10.1038/s41598-020-77101-2)
- 8 Malik S., Rana V., Joshi G., Gupta P.K., Sharma A. Valorization of wheat straw for the paper industry: Pre-extraction of reducing sugars and its effect on pulping and papermaking properties. In: *ACS Omega*, 2020: Vol. 5, Issue 47. P. 30704–30715. (doi.org/10.1021/acsomega.0c04883)
- 9 Muhammad Irshad. Production and optimization of ligninolytic enzymes by white rot fungus *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid state medium banana stalks. In: *Afr. J. Biotechnol.*, 2011: Vol. 10, Issue 79. (doi.org/10.5897/AJB11.2242)
- 10 Ververis C., Georghiou K., Danielidis D., Hatzinikolaou D.G., Santas P., Santas R., Corleti V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. In: *Bioresour. Technol.*, 2007: Vol. 98, Issue 2. P. 296–301. (doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.007)
- 11 Wang Lei, Wang Wangui, Ji Xiang, Cai Lu. Biodegradation of lignin by the white rot fungus *Polyporus varius* and its promising potential for biopulping. In: *Renew. Energy Environ.: Int. Conf. Mater.* -Shanghai, 2011: P. 464–468.
- 12 Xiong Y., Zhao Y., Ni K., Shi Y., Xu Q. Characterization of ligninolytic bacteria and analysis of alkali-lignin biodegradation products. In: *Pol. J. Microbiol.*, 2020: Vol. 69, Issue 3. P. 339–347. (doi.org/10.33073/pjm-2020-037)
- 13 Xu G., Wang X., Hu J. Biobleaching of wheat straw pulp using laccase and xylanase. In: *BioResources*, 2013: Vol. 8, Issue 3. P. 3181–3188.
- 14 Kumar V. P., Sridhar M., Rao R. G. Biological depolymerization of lignin using laccase harvested from the autochthonous fungus *Schizophyllum commune* employing various production methods and its efficacy in augmenting in vitro digestibility in ruminants. In: *Scientific Reports*, 2022. Vol. 1, Issue 12. Art. ID 11170. (doi.org/10.1038/s41598-022-15211-9).