

КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

С. Федот

ФЕДОТОВ ОЛЕГ ВАЛЕРІЙОВИЧ

АКТИВНІ ПРОДУЦЕНТИ МОЛОКОЗГОРТАЮЧИХ ФЕРМЕНТІВ
СЕРЕД ГІМЕНОМІЦЕТІВ, ЇХ БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ
ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ

03.00.12 - фізіологія рослин

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1995



ДВ 32.822

Наукові керівники: доктор біологічних наук, професор
Негруцький Сергій Федорович,
кандидат біологічних наук, доцент
Бойко Михайло Іванович.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Соломко Ельвіра Федорівна,
доктор біологічних наук, професор,
академік УААН
Бойко Анатолій Леонідович.

Провідна організація: Дніпропетровський державний
університет.

Захист дисертації відбудеться "24" вересня 1995р. о 14⁰⁰
годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.01.07
для захисту дисертацій на біологічному факультеті Київського
університету ім.Тараса Шевченка за адресою: м.Київ - 127, про-
спект Глушкова, 2.

Поштова адреса: 252033, Київ-33, вул.Володимирська, 64,
спецрада Д 01.01.07, біологічний факультет.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці університету.
Автореферат розіслано "21" серпня 1995р.

Учений секретар спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук, професор *Брайтон* О. В. Брайтон

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. До найважливіших проблем розвитку сучасної біологічної науки в Україні належать питання охорони та збереження генофонду рослинного та тваринного світу, дослідження біологічного різноманіття, а також розробка засобів штучного відтворення і використання окремих видів у нових нетрадиційних технологіях. Об'єктами нових технологій все ширше стають культури тканин окремих видів рослин та вищих грибів, зокрема їстівних макроміцетів, плоді тіла яких давно використовуються у різних країнах світу як харчовий та лікарський продукт [Cohran, 1978; Stamets, 1984; Yong, Yong, 1987; Mori ex al., 1987]. Перспективність використання культур гіменоцітетів як об'єктів сучасних біотехнологій одержання білку харчового та кормового призначення, ліків та різноманітних біологічно активних сполук, зокрема ферментів, вже не викликає сумнівів [Соломко, Дудка, 1985].

Однак, пошуки активних продуцентів охоплюють досить вузьке коло систематичних груп грибів. Наведені дані стосуються, як правило, характеристики ферментних препаратів різного ступеня очищення, а біологічна роль протеїназ в процесах метаболізму вищих грибів, біосинтезу ферментів молокозгортаючої (МЗ) дії, у гіменоцітетів залишаються мало дослідженою галуззю практичної мікології. Разом з тим, пошук нових можливих продуцентів протеїназ, дослідження їх властивостей з метою залучення їх у біотехнологічне виробництво дозволили б зняти дефіцит традиційно використовуваного в сироробстві ренніну, адешевити та розширити виробництво, а'ясувати нові напрямки застосування отриманих ферментних

препаратів.

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було проведення порівняльної оцінки молокозгортаючої активності (МЗА) серед великого мікологічного матеріалу, виявлення активних штамів - продуцентів, вивчення їх біологічних особливостей та перспектив застосування у біотехнології.

Щоб досягти цієї мети, були поставлені та вирішені наступні основні завдання:

- вивчити здібність гіменоміцетів до синтезу молокозгортаючих протеїназ;
- розробити методику експрес-аналізу з первинного відбору перспективних продуцентів;
- визначити ступінь залежності МЗА культурального фільтрату (КФ) штамів, що вивчалися, від різноманітних компонентів живильного середовища та їх концентрації;
- встановити вплив рН і температури ферментації на біосинтетичну функцію та накопичення біомаси культурами макроміцетів;
- відстежити зміни величин рН, МЗА, вмісту редуруючих цукрів у довгостроковій динаміці росту;
- отримати ферментні препарати у кристалоподібному вигляді з подальшим вивченням деяких фізичних, біохімічних та медикобіологічних характеристик продукту;
- з'ясувати можливість застосування культур базидіоміцетів в якості продуцентів протеїназ молокозгортаючої дії.

Наукова новизна. У роботі вперше наводяться результати дослідження МЗА близько 350 штамів гіменоміцетів, що належать до 98 видів, 48 родів. З яких більш як 62 % становлять види афілофорових грибів - ксилотрофів штучних і рекреацій-

них лісонасаджень Донбасу, що раніше не досліджувались.

Отримані нові дані про рівень МЗА у культурах базидіоміцетів різних систематичних, екологічних (трофічних) груп. При цьому, з'ясованні тенденції розподілу МЗА в родинах і трибах вивчених порядків, що полегшує подальший пошук перспективних продуцентів протеїна.

Підтверджена здатність до активного біосинтезу протеїна МЗ дії ксилотрофів, провокуючих білу (пістряву) трухлявість деревини. Види агарикових грибів з великим рівнем МЗА, також, пристосовані до деревини чи багатим органікою субстратам.

Виявлено вплив екологічних факторів та умов культивування на біосинтез "сичужних" ферментів і тенденції аміні показників рН і МЗА КФ при довгостроковій ферментації. Встановлено наявність двох максимумів МЗА у більшості штамів.

Вперше із досліджуваних штамів виділені ферментні препарати у кристалічному вигляді МЗ дії. Вивчені деякі їх характеристики, на яких показана перспектива застосування МЗ - активних штамів у біотехнології ферментів харчового та медичного призначення.

Практична цінність. Одержані дані про розподіл МЗА у систематичних групах базидіоміцетів дозволяють прогнозувати пошук штамів з великими біосинтетичними можливостями. Рівень МЗА в культурах можна використати як додаткову хемотаксономічну ознаку.

Попередній пошук продуцентів МЗ ферментів дозволив відібрати найбільш активні штами. Вивчені їх характеристики в культурі, доведена можливість їх культивування в промислових умовах.

Розроблені засоби отримання ферментних препаратів, здатні до застосування в промислових умовах. Деякі ферментні препарати, що пройшли медико-біологічні дослідження, виявили відсутність патогенного впливу на тваринний організм. Тим самим доведена можливість застосування їх, після додаткових дослідів, у харчовій, косметичній і інших галузях промисловості.

Положення, які виносяться на захист:

1. Закономірність розподілу МЗ - активних видів серед різних таксономічних і екологічних груп грибів, що встановлена на підставі вивчення 350 культур (48 родів; 98 видів).

2. Специфіка дії фізичних (рН, температура) та хімічних (склад поживного середовища) умов культивування на біосинтетичну функцію ксилотрофів, та на зміну величини МЗА КФ під час довгострокової ферментації продуцентів.

3. Отримані ферментні препарати мають близькі з ренніном фізико-хімічні показники.

4. Відсутність патогенного та токсичного впливу на тваринний організм одержаних МЗ препаратів дозволяє стверджувати перспективність селектованих штамів для подальшої розробки шляхів їх застосування у біотехнологічних виробництвах.

Апробація роботи. Основні положення дисертації викладено на: Міжнародній конференції "Проблеми лісової фітопатології і мікології" (Каунас, 1991); конференції молодих вчених "Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики" (Київ, 1992); Міжнародній конференції молодих вчених "Проблеми лісової біогеоценології та методологічні основи їх вирішення" (Йошкар-Ола, 1992); IX з'їзді Українського ботанічного товариства (Київ, 1992); Міжнародній науковій конфе-

ренції " Промислова ботаніка: стан і перспективи розвитку " (Кривий ріг, 1993); щорічних наукових конференціях ДонДУ (Донецьк, 1993 - 1995); Міжнародних і Всеукраїнських студентських конференціях (Донецьк, 1994 - 1995; Київ, 1995).

Наукові публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 17 робіт, 2 статті здані до друку.

Структура і об'єм роботи. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, описання об'єктів і методів дослідження, 3 глав експериментальних досліджень, обговорення результатів, висновків і додатку. Список літератури включає 357 джерел. Роботу викладено на 250 сторінках друкованого тексту, вона включає 14 таблиць і 48 рисунків.

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами досліджень були вегетативні культури 98 видів 48 родів базидіальних грибів з порядків Aphyllorphorales і Agaricales, що належать головним чином до екологічної (трофічної) групи - ксилотрофів. Переважна більшість (92,5%) штамів отримана за нашою участю з природних джерел м. Донецька і Донецької обл., 5% штамів інтродуковано в культуру з плодових тіл грибів, зібраних у Хмельницькій обл. та м. Львові. Чисті культури зберігаються на кафедрі фізіології рослин ДонДУ.

Методи дослідження. Для оцінки МЗ-активності КФ, базидіальні гриби вирощували поверхнево у колбах Ерленмейера, ємністю 250 мл, на рідких поживних середовищах: сусло-пептонне, глюкозо-пептонне, об'ємом 50 мл [Федорова, Шварина, 1974]. Початкова рН 4,4 - 5,6 одиниць. Температура культивування 29 - 30°C.

МЗА КФ визначали у процесі росту через кожні 5 діб протягом 30 днів при пошуку МЗ-активних штамів та через кожні 3 доби протягом 20 днів у МЗ-активних штамів за методикою Кавай, Мукаї [Kawai, Mukaï, 1970; Ниговская, 1979]. Казеінолітичні властивості вивчали при вирощуванні культур на знежиреному молоці [Билай, 1982].

Ростові показники на агаризованих середовищах оцінювали за лінійною швидкістю росту та на підставі розрахунку ростових коефіцієнтів [Бисько, Бухало, Вассер и др., 1983; Бухало, 1982]. Накопичення біомаси визначали ваговим методом після фільтрації, промивки та висушування міцелія.

Для встановлення розподілу МЗА серед таксонів, штами розташовували за систематикою [Бондарцев, 1953; Бондарцева, 1983; Moser, 1978]. Математичне планування експериментів при пошуку оптимальних умов включало 10 градацій температури, 7 - рН, 20 сполук, що містять вуглець і 16 сполук, що містять азот [Адлер и др., 1976]. Виділення і очищення ферментних препаратів (ФП) проводили сульфатом амонію [Гродаинский, Гродаинский, 1973; Уебб, 1982; Досон, Елліот и др., 1991]. Вміст амінокислот ФП вивчали за допомогою розподільної хроматографії на папері та колонці [Загордонец, 1982]. Кислотна, лужна, термічна стабільності, оптимум рН і t^0 ферментативних реакцій ФП вивчались на єдиному субстраті - молоці [Кочетов, 1980]. Весь одержаний експериментальний матеріал оброблено статистично [Лакін, 1980].

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Проведений аналіз літературних даних щодо вивчення ме-

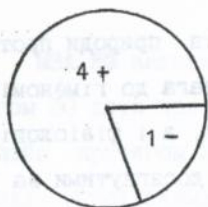
ханізмів протеолізу вищих базидіоміцетів та природи протеїназ цих організмів дозволяє вважати, що увага до гіменоміцетів не тільки систематиків і фітопатологів, а і фізіологів і біохіміків пояснюється значними успіхами, досягнутими за останні роки у галузі вивчення їх первинного та вторинного біосинтезу. Інтенсивно йдуть роботи із застосування целлюлолітичних грибів з метою біоконверсії лігноцелюлозних комплексів у білок та фізіологічно активні речовини, вивчення їх протеолізу.

1. Пошук можливих продуцентів протеїназ молокозгортаючої дії серед гіменоміцетів.

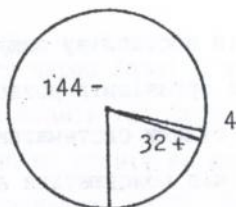
Отже, пошук можливих продуцентів ферментів, і в тому числі молокозгортаючої (МЗ) дії, став логічним продовженням вивчення можливостей використання культур гіменоміцетів. З цієї метою досліджено близько 350 штамів афілофорових і агарикових грибів, для яких з'ясовані максимальні значення молокозгортаючої активності у культурі та головні показники росту, що спостерігаються при цьому: зміна кислотності живильного середовища, накопичення біомаси. Для пошуку МЗ активних штамів, в основному (95%) використовували культури, що виділені з природних джерел Донбасу - малодосліджених до теперішнього часу.

Рівні рівні МЗА в культурі відмічені у переважній більшості (96,6%) штамів дереворуйнівних афілофорових грибів. Причому, найбільш активні штами, МЗА КФ яких була вищою 10000 од/мл, становлять більш 19,6% від досліджених (рис.1).

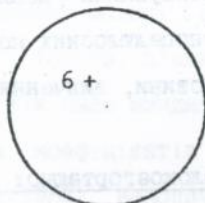
Штами родів *Chaetoporus* Karst., *Schizophyllum* Fr., *Tyromyces* Karst., *Irpex* Fr. і деякі штами родів *Fibuloria* Bond. et Sing., *Oxyporus* (B. et A.) Donk. з високою МЗА у культурі



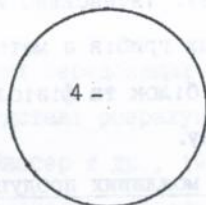
1. Corticiaceae (5, 2, 2)



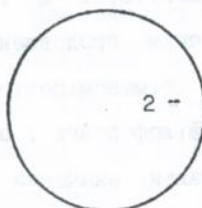
5. Polyporaceae (180, 61, 25)



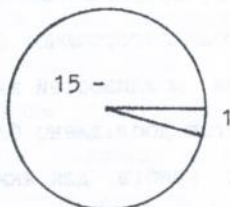
2. Schizophyllaceae (2, 1, 1)



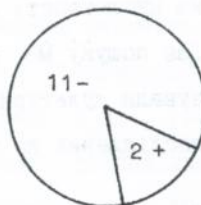
6. Ganodermaceae (4, 2, 1)



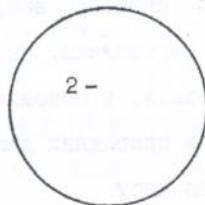
3. Fistulinaceae (2, 1, 1)



7. Hymenochaetaceae (16, 7, 2)



4. Caloporaceae (13, 5, 3)



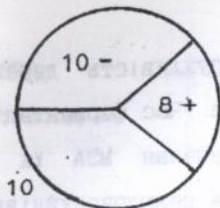
8. Arthropiaceae (2, 1, 1)

Рис. I Розподіл штамів різної МЗА у родинях афілофорових грибів.

Число штамів з МЗА понад 10000 од/мл - + ;

до 10000 од/мл - - ; не відзначеної - .

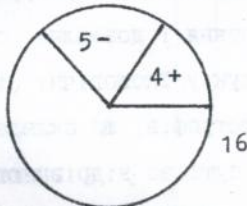
У дужках указано число вивчених штамів, видів і родів.



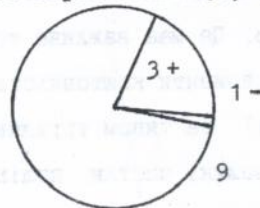
1. Pleurotaceae (28, 5, 2)



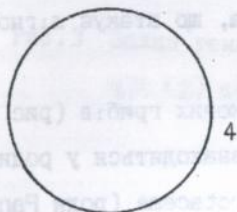
4. Coprinaceae (1, 1, 1)



2. Tricholomataceae (25, 5, 4)



5. Strophariaceae (13, 5, 3)



3. Agaricales (4, 2, 1)

Рис. 2 Розподіл штамів різної МЗА у родинах агарикових грибів.

Число штамів з МЗА понад 1000 од/мл - + ;
до 1000 од/мл - - ; не відзначеної - .

У дужках указано число вивчених штамів видів і родів.

викликають білу, коровійну чи пістряву трухлявість деревини і відносяться до лігнінруйнівних грибів. Час ферментації, при якому були зафіксовані максимальні значення МЗА їх КФ значно (в 1,5-1,8 рази) менше ніж у штамів целлюозоруйнівних грибів, що викликають деструктивну буру чи червону трухлявість. Це має важливе технологічне значення і дозволяє суттєво знизити кошовність кінцевого продукту. Екологічні (трофічні) за типом трухлявості групи ксилотрофів, що складають дві великі частки поліпорових грибів, суттєво відрізняються з ферментативної активності. Можливо, у афілофорових грибів, провокуючих білу трухлявість деревини, еволюційно сформувалась більш активна протеолітична система, що атакує лігноцелюлогічні комплекси.

МЗА знайдена у 44,5% культур агарикових грибів (рис. 2). Найбільш МЗ-активні штами цього порядку знаходяться у родинях Tricholomataceae (під Flammulina), Pleurotaceae (роди Panus, Pleurotus) та Strophariaceae (під Kuehneromyces). Види, що належать до лігноцелюлогічних та багатих органікою субстратів: ксило-, сапро- і капротрофи, також відрізняються більш високим рівнем активності. Але порівняна оцінка МЗА КФ штамів порядків Aphyllophorales і Agaricales дозволяє зробити висновок про більш високу (в 2-4 рази) біосинтетичну функцію афілофорових грибів на застосованому у досліді сушло-пептонному середовищі.

2. Культурально-морфологічні особливості деяких МЗ-активних штамів.

Відібрані для подальшого вивчення морфологічних і культуральних особливостей, культури 26 МЗ - активних видів афілофорових грибів з родів Amylporia, Chaetoporus, Fibulopo-

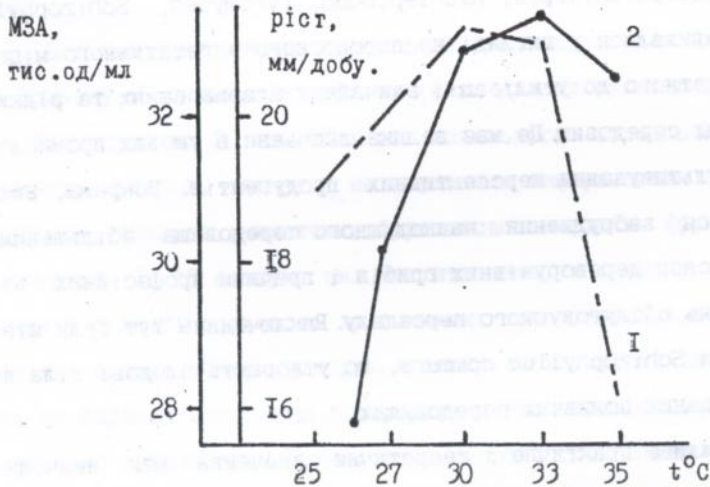


Рис.3 Вплив температури на лінійний ріст (I) і МЗА (2) штаму С-070 (*Tyromyces undosus*).

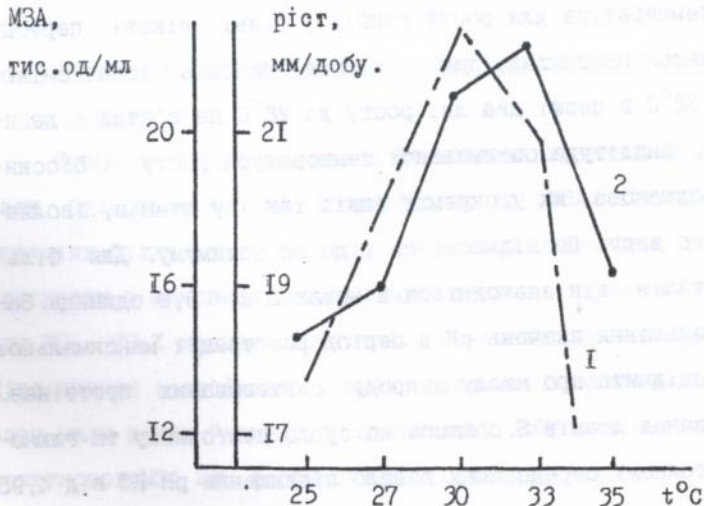


Рис.4 Вплив температури на лінійний ріст (I) і МЗА (2) штаму А-025 (*Tyromyces revolutus*).

ria, Gloeoporus, Irpex, Mycoleptodon, Tyromyces, Schizophyllum розвивалися у вигляді неспорозного вегетативного міцелію, адатного до утилізації звичайних агаризованих та рідких поживних середовищ. Це має велике значення в умовах промислового культивування перспективних продуцентів. Зокрема, виключаються забруднення навколишнього середовища збільшеними дозами спор дереворунівних грибів і причини професійних захворювань обслуговуючого персоналу. Виключенням тут були штами гриба *Schizophyllum commune*, що утворюють плодові тіла на агаризованих поживних середовищах.

Важливе практичне і теоретичне значення має вивчення впливу зовнішніх факторів на приріст і фізіологічну активність грибів. Встановлено, що для синтезу протеїна з молокозгортаючої дії штами родів *Irpex*, *Tyromyces*, *Chaetoporus* потребують вищої (30-35⁰C) температури, ніж для лінійного росту та накопичення біомаси (27-33⁰C) у культурі (рис 3,4). Оптимальна температура для росту грибів у різні вікові періоди змінювалась. Наприклад, для *Tyromyces undosus* вона змінюється з 32⁰C в перші два дні росту до 28⁰C на п'ятий - десятий день. Амплітуда оптимальної температури росту і біосинтезу неоднакова, як у окремих видів так і у штамів, ізольованих одного виду. Це відноситься і до рН оптимуму. Для більшості штамів він знаходиться в межах 3,8 - 5,0 одиниць. Зазначено зниження значень рН в період рєстрації максимальної МЗА, що свідчить про кислу природу синтезованих протеїназ. Культивування штамів *S. commune* на сусло-пептонному та глюкозо - пептонному середовищах давало підвищення рН КФ від 4,95 до 5,25 одиниць, що підтвержує літературні дані про синтез цим грибом нейтральних протеїназ [Schwalb, 1977; Денисова,

1984).

Під час дослідження перевіряли придатність для живлення та синтезу МЗА ферментів тих чи інших джерел вуглецю та азоту. Застосування 20 компонентів живильного середовища, які містять вуглець, вказує на переважне використання грибами крохмалю, глюкози, мальтози, бурштинової кислоти, фруктози і гліцерина. Із 16 сполук, які містять азот, доданих у еквівалентній з азоту кількості до поживних середовищ, тільки пептон дав велику МЗА у культурі. Можливо, ксилотрофи, що мешкають на багатих органічних лігно-целюлозних комплексах, більше здатні до утилізації органічного азоту. Особливий інтерес становило довгострокове культивування продуцентів протеїна, що дозволило встановити генетично закріплені ознаки метаболізму. Так, ферментативна активність у динаміці росту мала два максимуми, за виключенням МЗА культури *S. commune*, що після повільного росту протягом 20 - 30 діб має платоподібну форму.

3. Отримання і характеристика ферментних препаратів молокозгортаючої дії.

Фракціонування і очистку ферментних препаратів здійснювали сульфатом амонію. Встановлено, що МЗА з'являється у фракціях білка, що відповідає 40 - 80 % насичення, ферментні препарати з максимальним молокозгортаючим ефектом отримані при 70 - 80 % концентрації солі. Осаджені фракції ферментів діалізували і ліофільно сушили. Отримані таким чином протеїнази мали різну "сичужну" активність, МЗА не залежала від початкової МЗА КФ, а обумовлювалось, в першу чергу, ступенем очищення від супутних сполук. Найбільш активні фракції білка у 5 - 12 разів перевищували за активністю традиційно вживаний

МЗА,

тис.од./мл

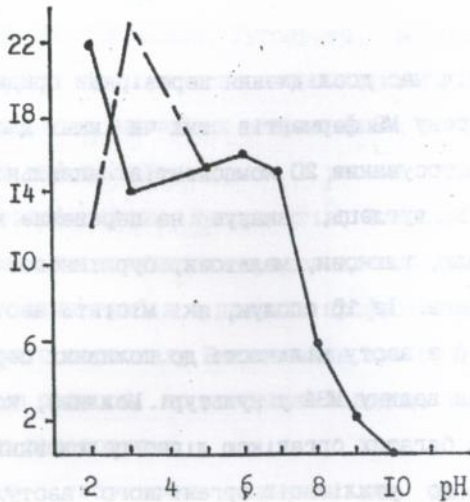


Рис.5 Залежність величини МЗА від рН ферментного розчину штаму А-025 (*Tyromyces revolutus*).

МЗА,

тис.од./мл

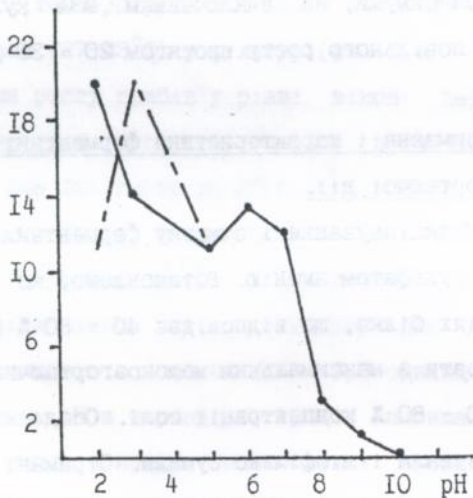


Рис.6 Залежність величини МЗА від рН ферментного розчину штаму А-027 (*Tyromyces lacteus*).

в сировиробництві промисловий сичужний фермент тваринного походження. Під час дослідження впливу підвищених температур (40 - 70°) на водні розчини ферментів, встановлена їх термічна нестабільність. Це виключає можливість застосування методу фракційної денатурації підігрівом для виділення МЗ ферментів.

Досліди з вивчення впливу рН ферментних розчинів на їх МЗ активність дозволили встановити різницю їх характеристик. Так, лужна денатурація має індивідуальний характер і настає при значеннях рН розчинів ферментів від 8 до 9 одиниць (рис 5, 6). При підкисленні розчинів від 4 до 2 одиниць, у всіх випадках мало місце підвищення їх активності.

Залежність МЗА від рН розчину фермента має два максимума, що не відмічається при впливі на сичужний фермент. Це можливо, викликане присутністю у препаратах декількох білків, здатних до денатурації казеїна. Застосування для регуляції рН розчинів ферментів двох кислот H_2SO_4 і HCl виявляє ріст активності ферментних препаратів у присутності HCl при однакових значеннях рН. Останнє, може свідчити про активуючу дію іонів Cl^- на ферментні молекули.

При вивченні амінокислотного складу білків одержаних грибних протеїназ і сичужного ферменту звертає увагу достатньо близьке процентне відношення амінокислот білку. Серед 4-х класів амінокислот, у структурі білку переважають аспарагінова та глутамінова кислоти з групи негативно-заряджених кислих амінокислот, що можливо визначає фізико-хімічні і біологічні особливості одержаних ферментних препаратів і має принципове значення, вказуючи на взаємозв'язок протеолітичних ферментів грибів та тварин.

Веручи до уваги галузі застосування ферментних препаратів, деякі з них (з *Amiloporia lenis*, *Tyromyces revolutus*, *Fibulotoria mollusca*) проходили медико-біологічні дослідження. Токсичність і патогенність їх КФ і ферментних препаратів перевіряли на безпородних білих мишах обох статей. Препарати вводили одноразово у шлунок та внутрібрюшно.

Встановлено, що представлені препарати ферментів, згідно з класифікацією гідролітичних ферментних препаратів мікробіологічного синтезу із ступеня небезпеки, відносяться до малобезпечних (4 клас), чи до таких, що не викликають яких-небудь примет інтоксикації.

Таким чином, проведені дослідження доводять перспективність пошуку активних продуцентів протеїнаа молокозгортаючої дії серед гіменоміцетів. Інтродуційовані штами з високим протеолізом можуть бути використані у біоінженерії. Можливість застосування звичайних дешевих поживних середовищ для промислової ферментації, відсутність споруляції та достатньо швидкий ріст у культурі дозволяє виростати баазидіоміцети в біотехнології ферментів. А після додаткових медико - біологічних досліджень отриманих ферментних препаратів, у харчовій промисловості, медицині та фармакології.

ВИСНОВКИ

1. На підставі експериментального дослідження великого мікологічного матеріалу встановлена здатність до біосинтезу протеїнаа молокозгортаючої (МЗ) дії у 96,6% штамів афілофорових грибів та у 44,5% - агарикових. Найбільша МЗ дія культурального фільтрату (КФ) представників з порядку *Aphyllorphorales* - відмічена у штамів родин *Corticaceae* (рід

Chaetoporus), Schizophyllaceae (під Schizophyllum), Polyporaceae (роди Fibuloporia, Tyromyces, Irpex, Amyloporia, Coriolus, Hirschioporus); МЗ - активні штами в порядку Agaricales частіше зустрічаються в родинях Tricholomataceae (під Flammulina), Pleurotaceae (роди Panus , Pleurotus), Strophariaceae (під Kuehneromyces).

2. Порівняльна оцінка максимальних значень молокоагортаційної активності (МЗА) культур грибів порядків Aphyllophorales та Agaricales показала більш високу (в 2-4 рази) біосинтетичну функцію афілофорових грибів. Штами, що причиняють біду трухлявість деревини (лігнінруйнівні) переважають серед МЗ-активних культур. Гриби, що розкладають лігноцелюлозні та багаті органікою субстрати: ксило-, сапро- і капротрофи відзначаються більш високими значеннями МЗА у культурі.

3. Виявлені закономірності розподілу МЗА у різних таксономічних і екологічних груп макроміцетів дають можливість цілеспрямованого пошуку перспективних продуцентів протеїназ МЗ дії серед визначених таксонів.

4. З випробуваних 20 сполук, що містять вуглець, і 16-тих, що містять азот, здатність посилювати синтез МЗ ферментів відмічена на живильних середовищах з крохмалем, глюкозою, мальтозою, бурштиною кислотою, фруктозою, гліцерином та пептоном.

5. Синтез МЗ протеїназ штамами родів Irpex, Tyromyces, Chaetoporus потребує більш високих температур (30-35⁰C), ніж для накопичення біомаси та приросту (27-33⁰C). Оптимум рН вивчених ксилотрофів знаходиться в межах 3,8-5,0 одиниць. МЗА у динаміці росту більшості досліджених грибів має два максимума, що спотерігаються при мінімальних значеннях рН, і вка-

аує на кислу природу метаболітів.

6. Найбільша активність чи кількість ферменту спостерігається у фракціях білку, осаджених при 70 - 80% насиченні $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Продуковані ксилотрофами протеїнази МЗ дії значно (в 5-12 разів) перебільшують активність традиційно вживаного в сировиробництві сичужного ферменту тваринного походження.

7. Виділені у кристалевому вигляді грибні ферментні препарати мають між собою близькі фізико-хімічні показники. Залежність МЗА від рН ферментного розчину двоверха чи плато-подібна. Збільшення активності ферментів спостерігається при рН від 4 до 2 одиниць, а при рН від 8 до 9 одиниць відмічена лужна денатурація. Амінокислотний склад препаратів вказує на великий відсоток аспарагінової та глутамінової кислот, що визначають кислу природу ферментів.

8. Порівняльний аналіз властивостей отриманих грибних препаратів та тваринного сичужного ферменту вказує на їх однакову природу. Медико-біологічні іспити МЗ препаратів показали відсутність патогенного та токсичного впливу на тваринний організм, що обґрунтовує принципову можливість використання їх у біотехнології ферментів для застосування в харчовій та переробній промисловостях.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Войко М. И., Негруцкий С. Ф., Федотов О. В., Полях В. А. Влияние различных источников углеродного питания на молоковертывающую активность *Hirschioporus loricinus* // Философские и естественно-научные аспекты антропологии. - Санкт-Петербург - Донецк, 1992. - с.117-120.
2. Войко М. И., Федотов О. В., Негруцкий С. Ф., Антимонова В. С.

- Базидиальные грибы как возможные продуценты протеиназ молокосвертывающего действия // Интродукция и акклиматизация растений на Украине. - Киев: Наук. думка, 1995.
3. Федотов О. В., Полях В. А. Грибы рода *Hirschioporus* - возможные продуценты протеиназ в условиях промышленного культивирования // Проблемы лесной биоценологии и методические основы их решения: Тез. докл. междунар. конф. молодых ученых (Йошкар-Ола, май, 1992г.). - Йошкар-Ола: МарПИ, 1992. - с. 61.
 4. Федотов О. В., Полях В. А. Грибы рода *Hirschioporus* как возможные продуценты молокосвертывающего фермента // Актуальные проблемы физиологии растений и генетики: Тез. докл. конф. молодых ученых (Киев, май, 1992г.). - Киев: ИФРИГ АН Украины, 1992. - с. 137.
 5. Федотов О. В., Бойко М. И., Полях В. А. Зависимость молокосвертывающей активности ферментов ксилотрофов от различных источников углеродного питания // Тез. докл. вузов. науч. конф. профессорско-преподавательского состава по итогам научно-исследовательской работы: Естественные дисциплины (Донецк, апрель, 1993г.). - Донецк: ДонГУ, 1993. - с. 75.
 6. Кібкало С. В., Федотов О. В., Вдовиченко В. В. Молокозгортаюча активність культур дереворуйнівних грибів: Тез. докл. Донецк. научн. и научн.-метод. конф. (Донецк, март, 1995г.). - Донецк, 1995. - с. 98.
 7. Федотов О. В., Бойко М. И., Негруцький С. Ф. Виділення грибних протеїназ молокозгортаючої дії // Дон. науч. конф. Донецьк, березень, 1995р.: Тези доповідей. - Донецьк, 1995. - с. 110 - 111.

АННОТАЦИЯ

Федотов О. В. " Активные продуценты молокосвертывающих ферментов среди гименомицетов, их биологические особенности и перспективы применения ".

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 - физиология растений, Киевский университет им. Тараса Шевченко, Киев, 1995.

На основе экспериментального изучения культур высших базидиомицетов (около 350 штаммов) получены новые данные об уровне молокосвертывающей активности в различных систематических группах афиллофоровых и агариковых грибов, характере взаимосвязи ферментативной активности с таксономическим положением и экологической принадлежностью макромицетов. Установлены биологические особенности активных штаммов продуцентов молокосвертывающих ферментов. Разработаны и апробированы конкретные технологические решения. Впервые получены ферментные препараты молокосветывающего действия для 12 штаммов. Анализ физико - химических и медико-биологических свойств полученных препаратов показал возможность применения их в перерабатывающих отраслях промышленности.

BRIEF INFORMATION

Fedotov O.V. Active productivities of milk coagulation enzymes between Heminomycetes, their biological peculiarities and perspectives of their utilisation.

Dissertation is submitted for candidate's degree of biological sciences, speciality - 03.00.12 - plant physiology. Kiev, 1995.

According to experimental studies of high Basidiomycetes (almost 350 species) there were received new facts about the level of milk coagulation in different systematic groups of Aphyllophorales and Agaricales, about the character of correlation of enzyme's activity with taxonomic position and ecological belonging of macromycetes. Biological peculiarities of active species of the productivities of milk coagulations enzymes were found. Concrete technological solution were worked out and elaborated. Enzyme's preparation of milk coagulation effect for 12 species were received for the first time. Analyses of physical-chemistry and medical-biological characteristics of the received preparations showed the possibility of their utilisation in different branches of industry.

Ключові слова: гіменомицети, штами, молокозгортаюча активність, ферментні препарати.

Handwritten scribbles at the top of the page.

Handwritten text, possibly a signature or date, located in the lower middle section of the page.

АВ 32.822

АВ 32.822

Безденко В. П. Активна продуктивність серед гоміоцістичних бактерій

Дисертація на здобуття ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.12 - фізіологія рослин, складена Бездененком В. П. Київський університет імені Шевченка, Київ, 1995. Інформація надана за підписом кандидата біологічних наук Бездененко В. П. Дисертація складається з вступу, трьох розділів, висновку та списку літератури. У першому розділі розглянуто загальні принципи фізіології рослин, характерні для гоміоцістичних бактерій. У другому розділі вивчено вплив різних факторів на активність рослинних гоміоцістичних бактерій. У третьому розділі вивчено вплив різних факторів на активність рослинних гоміоцістичних бактерій. У висновку наведено основні результати дослідження та висновки. Список літератури складає 120 назв.

Кандидат В. П. Активна продуктивність у рослинних гоміоцістичних бактеріях: їх біологічна активність та перспективи їх використання.

Дисертація подана на здобуття ступеня кандидата біологічних наук, спеціальність - 03.00.12 - фізіологія рослин.

Дисертація складається з вступу, трьох розділів, висновку та списку літератури. У першому розділі розглянуто загальні принципи фізіології рослин, характерні для гоміоцістичних бактерій. У другому розділі вивчено вплив різних факторів на активність рослинних гоміоцістичних бактерій. У третьому розділі вивчено вплив різних факторів на активність рослинних гоміоцістичних бактерій. У висновку наведено основні результати дослідження та висновки. Список літератури складає 120 назв.

Зам № 20-086, тир. 100 ПО " ЧАЙКА "
м Донецьк, вул.Щорса, 21, 1995.

Дисертація складається з вступу, трьох розділів, висновку та списку літератури. У першому розділі розглянуто загальні принципи фізіології рослин, характерні для гоміоцістичних бактерій. У другому розділі вивчено вплив різних факторів на активність рослинних гоміоцістичних бактерій. У третьому розділі вивчено вплив різних факторів на активність рослинних гоміоцістичних бактерій. У висновку наведено основні результати дослідження та висновки. Список літератури складає 120 назв.

Дисертація складається з вступу, трьох розділів, висновку та списку літератури. У першому розділі розглянуто загальні принципи фізіології рослин, характерні для гоміоцістичних бактерій. У другому розділі вивчено вплив різних факторів на активність рослинних гоміоцістичних бактерій. У третьому розділі вивчено вплив різних факторів на активність рослинних гоміоцістичних бактерій. У висновку наведено основні результати дослідження та висновки. Список літератури складає 120 назв.