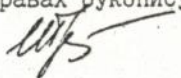


НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ім. М.Г.ХОЛОДНОГО

На правах рукопису



ТРУТНЕВА Ірина Анатоліївна

ПЕКТОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ  
ВИЩИХ БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ

03.00.24 - Мікологія

АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1995

582.28

AB 33.045

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у лабораторії грибів Інституту ботаніки раторії клітинної біології та генетичної клітинної біології та гене

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00761189 (W)

Науковий керівник - доктор біологічних наук

Даниляк Микола Ілліч

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук

Бухало Ася Сергіївна

- кандидат біологічних наук

Айзенберг Вікторія Леонідовна

Провідна організація - Донецький державний університет

Захист відбудеться "25" *травня* 1995 р. о

..... год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 50.06.01 в Інституті ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України за адресою: 252004, Київ-4, вул.Терещенківська, 2 .

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотечі Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України за адресою: 252025, Київ-25, вул. В.Житомирська, 28.

Автореферат розісланий "21" *вересня* 1995 р.

ЛНБ ім. В. Стефаника

Вчений секретар АН України спеціалізованої вченої ради кандидат біологічних наук

І. Л. Навроцька

**Актуальність проблеми.** Ферментні системи відіграють визначальну роль у життєдіяльності вищих базидіальних грибів. Останні за допомогою екзоклітинних ферментних комплексів розкладають у природних умовах величезні кількості рослинних залишків, що містять складні біополімери - пектинові речовини, целюлозу, лігнін та геміцелюлози. Ці біополімери розпадаються до моноцукрів і служать основним джерелом живлення грибів указаної групи. Від активності й ефективності екзоклітинних ферментів прямо залежать всі інші метаболічні процеси, ріст та розвиток цих грибів.

**Актуальність вивчення питань,** пов'язаних з функціонуванням екзоклітинних ферментів базидіальних грибів, має два аспекти. По-перше, це пізнання глибоких фундаментальних процесів перетворення основних органічних речовин у природних екосистемах. По-друге, це використання вищих базидіальних грибів у різних біотехнологічних процесах, коли потрібно провести підбір грибів продуцентів та відповідних субстратів, а також оптимізувати параметри технології.

Вибір пектолітичних ферментів вищих базидіальних грибів як об'єкта дослідження обумовлений тим, що, по-перше, базидіальні гриби є головною групою організмів-редуцентів біополімерів рослинного походження, і, по-друге, в великому комплексі екзоклітинних ферментних систем пектинази займають особливе місце - вони першими вступають у контакт з рослинними субстратами і відкривають доступ до клітинних стінок для інших груп ферментів. Такий вибір також актуальний у зв'язку з тим, що ця група ферментів вищих базидіальних грибів досліджена найбільш слабо.

У зв'язку з цим метою даної роботи є дослідження основних властивостей, закономірностей функціонування пектиназ вищих базидіоміцетів та можливостей їх використання в біотехнології. Для

досягнення поставленої мети були зформульовані такі задачі:

- вивчити пектолітичну активність культур вищих базидіоміцетів і встановити закономірності між рівнем активності та належністю до певних систематичних та екологічних груп;

- з'ясувати вплив умов культивування грибів на продукування пектолітичних ферментів;

- встановити склад пектолітичного комплексу та вивчити деякі фізико-хімічні властивості цих ферментів вищих базидіальних грибів;

- розробити науково обгрунтовані принципи використання пектолітичних ферментів вищих базидіальних грибів для конверсії рослинних відходів і одержання біологічно активних речовин в біотехнологічних процесах.

**Положення, що виносяться на захист:**

- активність пектолітичних ферментів вищих базидіоміцетів обумовлюється як систематичним положенням, так і належністю до певних екологічних груп грибів;

- пектолітичні комплекси вищих базидіальних грибів при загальній подібності відрізняються за кількісним складом полігалактуроаз і пектинестераз в ізозимних спектрах та за їх фізико-хімічними властивостями від пектиназ дейтероіцетів;

- гриби-ксилотрофи є перспективними для біоконверсії багатотонажних лігноцелюлозних відходів та обробки лікарської рослинної сировини з метою одержання біологічно активних речовин.

**Наукова новизна.** Подана робота є першим систематизованим дослідженням, в якому на базі аналізу відомих даних та результатів власних порівняльних досліджень 123 штамів 68 видів вищих базидіальних грибів показані основні закономірності вияву активності пектолітичних ферментів в залежності від їх систематичної та екологічної належності.

У ряду видів з різних систематичних груп досліджена залежність між рівнем продукування пектиназ та умовами культивування грибів та підбрані оптимальні умови для перспективних грибів-продуцентів.

Виділення та розділення комплексу пектолітичних ферментів вищих базидіальних грибів дозволило встановити фракції білкових форм полігалактуроназ, екзополігалактуроназ та пектинестераз з різною молекулярною масою та питомою активністю, а також виділити та дослідити множинні молекулярні форми пектолітичного комплексу на прикладі таких грибів, як: *Coriolus hirsutus* (Wolf.: Fr.) Quel. та *Calvatia utriformis* (Bull.: Pers.) Jaap..

Розроблені та обгрунтовані наукові принципи підбору грибів-продуцентів та використання пектолітичних ферментів для біоконверсії рослинних відходів сільського господарства та деяких інших виробництв, а також для одержання біологічно активних речовин з лікарської рослинної сировини.

Одержані результати мають важливе значення для розуміння фізіології вищих базидіоміцетів та обгрунтування наукових принципів біотехнологічних процесів з використанням цих грибів.

**Практичне значення роботи.** Робота має практичне значення для розробки методичних основ біотехнологічних процесів з використанням вищих базидіальних грибів, в ній подані відомості та науково обгрунтовані принципи підбору грибів-продуцентів з певних систематичних груп у відповідності до поставленої практичної задачі. Досліджені та відібрані штами-продуценти грибів, перспективні для одержання пектолітичних ферментів та повної біоконверсії лігноцелюлозної сировини.

Депоновано у колекцію чистих культур Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України такі штами грибів, що перспективні для біоконверсії рослинної сировини: відходів сільського господарства

та інших виробництв.

Отримані вихідні дані по оптимумам рН, температурі та стабільності ферментів, що можуть бути використані в біотехнологічних процесах для гідролізу лікарської рослинної сировини, для збільшення виходу біологічно активних речовин.

Одержані наукові та практичні результати можуть бути використані при створенні промислових біотехнологій, при написанні монографічних робіт по ферментним системам та біотехнології грибів та при підготовці курсів лекцій для студентів ВУЗів.

**Апробація роботи.** Матеріали роботи доповідались та обговорювались на VI конференції молодих вчених-ботаніків України (м.Київ, 1979), на Всесоюзному симпозиумі "Применение и получение иммобилизованных ферментов в научных исследованиях, промышленности и медицине" (Ленинград, 1980), на Всесоюзній конференції "Мицелиальные грибы (физиология, биохимия, биотехнология)" (Пушино, 1983), на II Всесоюзній нараді "Производство высших съедобных грибов в СССР", (Чернигів, 1985), на X конгресі мікологів Європи (Таллінн, 1989), на III Всесоюзній конференції "Биосинтез целлюлозы и других компонентов клеточной стенки" (Казань, 1990), на наукових засіданнях відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, на засіданнях мікологічної секції УБТ.

**Публікації результатів досліджень.** За матеріалами дисертації опубліковано 45 робіт: з них 1 монографія, 9 статей, нові елементи роботи захищені 7 авторськими свідоцтвами СРСР на винаходи. В монографії "Ферментные системы высших базидиальных грибов" дисертантом написані стор. 137-163, 176-183, 221-228. У співавторстві з Л.Г.Дудченко опубліковані статті у Укр. ботан. журналі, а також подані матеріали на конференції та з'їзди УБТ та ряд інших, які написані у результаті спільної творчої участі співавторів. В роботах, що зроблені у співавторстві з іншими,

І. А. Трутнева виконувала, планувала та обговорювала ту частину, що стосувалася пектолітичних ферментів.

**Структура і об'єм роботи.** Дисертація об'ємом 162 сторінок складається з вступу, 6 розділів, висновків, списку використаної літератури, ілюстрована 21 таблицями та 30 рисунками.

## Розділ I. ПЕКТОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ ЯК СКЛАДОВА ЧАСТИНА ФЕРМЕНТНИХ СИСТЕМ ВИЩИХ БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ

Ферментні системи вищих базидіальних грибів відіграють основну роль в біодеструкції природних складних субстратів. Для більшості вищих базидіоміцетів характерним субстратом є деревина та рослинні залишки лісної підстилки. Здатність цих організмів до деструкції високомолекулярних субстратів зберігається в умовах культури. Вони синтезують та виділяють у середовище ферментні системи, що каталізують перетворення таких рослинних біополімерів як полісахариди, білки, лігнін. В біодеструкції цих субстратів рослинного походження велике значення мають целулази, ксиланози, хітинази, лігнолітичні, пектолітичні ферменти, а також протеїнази. Пектолітичні ферменти відіграють ключову роль в цих процесах, тому що вони є одними з перших які вступають в контакт з субстратом.

Пектолітичний комплекс добре вивчений у фітопатогенних грибів, тоді як ретельних досліджень по пектолітичним ферментам вищих базидіальних грибів до цього часу не проводилося.

## Розділ II. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами досліджень були культури вищих базидіальних грибів, одержаних з колекції БІН РАН ім. В. Д. Комарова, Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Інституту мікробіології Чеської АН, всього 123 штама 68 видів з порядків Boletales, Agaricales, Aphyllophorales, Russulares та групи порядків Gasteromycetes. В роботі прийняті за основу системи М. Мозера

(Moser, 1983) для агарикальних грибів та В.Юліха (Julich, 1984) для афілофоральних та гастероміцетальних грибів.

Вирощування чистих культур вищих базидіальних грибів здійснювали на рідких поживних середовищах глибоким методом та методом поверхневої плівки. За основу прийняте поживне середовище Норкранс (Norkrans, 1950) з різними модифікаціями.

Для визначення пектинестеразної активності використовували титриметричний метод Кертца в модифікації Ліфшиць ( Унифицирование методов... 1967). Активність ендополігалактуронази визначали віскозиметричним методом, активність екзополігалактуронази методом, що базується на урахуванні збільшення вмісту відновних груп у результаті дії ферментів ( Унифицирование методов... 1967). Визначення білка проводили за методом Лоурі (Lowry & al., 1952). Вибіркову сорбцію ферментного комплексу з культурального фільтрату здійснювали за допомогою карбоксильного катіоніту типу КМТ (біокарб Т). Очищення ферментних препаратів від пігментів та баластного білка проводили на аніоніті ФАФ (Самсонов и др., 1975).

Гельхроматографію ферментних препаратів здійснювали на ультрагелі АСА-54. Диск-електрофорез в поліакріламідному гелі проводили за методом Девіса (Маурер, 1971). Аналітичне ізофокусування у градієнті густини сахарози здійснювали у колонці, лінійний градієнт рН створювали за допомогою суміші амфолінів. Характеристику використаних пектинів давали за методикою Г.В.Бузіної (Бузіна, 1960).

Лікарську сировину обробляли ферментним препаратом з *Corgiolus hirsutus* нестерильно. Ефірну олію м'яти одержували методом дистиляції з водяним паром у апараті Гінзберга (Ермаков и др., 1972). Визначення діосгеніну проводили фотометрично (Пасешниченко и др., 1972), контроль якості діосгеніну проводили за

допомогою хроматографії (Фонин и др., 1976).

Характеристика дії ферментного препарату з *S.hirsutus* на вихід виноградного соку та його технологічні показники проведена за методами технохімічного та технологічного контролю в виноробстві (Методы технохимического ..., 1980).

Математична обробка результатів експерименту складалась в оцінці найбільш вигоідного значення величини, яка вивчалася. Обробка даних проводилась згідно прийнятим методам статистичної обробки експериментів (Кокунин, 1975; Маслов, 1978). В роботі приведені статистично достовірні результати.

### Розділ III. ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕКТОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ВИЩИХ БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ РІЗНИХ СИСТЕМАТИЧНИХ ТА ЕКОЛОГІЧНИХ ГРУП

Проведене порівняльне дослідження грибів з порядків *Boletales*, *Agaricales*, *Russulales*, *Aphyllorphorales*, а також групи порядків *Gasteromycetes* показало, що активність пектолітичних ферментів має певну залежність від систематичного положення грибів. Найбільша активність пектиназ встановлена у представників порядку *Agaricales* (роди *Panus*, *Pholiota*) та порядку *Aphyllorphorales* (роди *Coriolus*, *Funalia*, *Fomitopsis*, *Laetiporus*, *Trametes*). Особливий інтерес викликає рід *Coriolus*. Види *S.hirsutus*, *S.pubescens*, *S.versicolor*, *S.zonatus* при значних штамових відмінностях мають високий рівень активності позаклітинних полігалактуроназ. Представники інших родів порядку *Agaricales*, а також порядків *Boletales*, *Russulales*, та групи порядків *Gasteromycetes* мали значно менший рівень активності пектиназ.

Екологічна належність грибів є визначальним фактором, який обумовлює активність пектолітичного комплексу. У ксилотрофів порядків *Agaricales* та *Aphyllorphorales* була встановлена найвища

активність пектолітичних ферментів, що добре узгоджується з положенням в екосистемах. Деревина є одним з важкодоступних джерел поживних речовин для мікроорганізмів, тільки наявність ферментних систем, в тому числі пектолітичного комплексу, забезпечує доступ до складного, проте найбільш поширеного у природі, комплексу біополімерів. Підстилкові сапротрофи та мікорізні гриби мають незначний рівень активності пектиназ. Пектолітичні ферменти ймовірно відіграють для них більшу роль в інших метаболітичних процесах, ніж в утилізації субстратів. Представники цих екологічних груп грибів використовують легкодоступні та модифіковані субстрати і у них немає необхідності у продукуванні високоактивних позаклітинних ферментів.

В результаті відібрано ряд штамів, що є перспективними для подальшої роботи: з порядку Agaricales - *Panus tigrinus*, шт. 122, *Pleurotus cornucopiae*, шт. 114, *Pholiota adiposa*, шт. 163, *Pholiota squarrosa*, шт. 60, *Armillariella mellea*, шт. 125, з порядку Aphyllorphorales - *Phellinus pini*, шт. 88, *Fomitopsis pinicola*, шт. 138, 139, 141, 142, *Funalia troglis*, шт. 96, 97, *Gloephyllum sepiarium*, шт. 8, 35, *Laetiporus sulphureus*, шт. 13, 14, 15, 84, *Oxyporus obducens*, шт. 85, *Polyporus brumalis*, шт. 105, *Trametes suaveolens*, шт. 23, 24, *Coriolus hirsutus*, шт. 18, 19, 20, 113, 136, 137, *Coriolus pubescens*, шт. 17, *Coriolus versicolor*, шт. 7, 44, 94, 129, 131, 132, *Coriolus zonatus*, шт. 21, 22, *Irpex lacteus*, шт. 144, з *Gasteromycetes* - *Calvatia utriformis*, шт. 57.

#### Розділ ІV. ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ПРОДУКУВАННЯ ПЕКТОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ВИЩИМИ БАЗИДІАЛЬНИМИ ГРИБАМИ

Умови культивування продуцентів поряд з підбором активних штамів є одним з найважливіших факторів регуляції їх активності. Нами проведено дослідження залежності активності пектолітич-

них ферментів від таких факторів, як спосіб культивування, джерела вуглецю та азоту, підбір дешевих субстратів для продукування цих ферментів.

Дослідження різних способів культивування для одержання пектолітичних ферментів показали, що глибинний спосіб культивування дозволяє досягти більш високого рівня цих ферментів. Це обумовлено, в основному, кращою аерацією та доступністю компонентів середовища порівняно з методом поверхневої плівки.

Легкодоступні джерела вуглецю - моноцукри та дицукри, сприяли накопиченню біомаси міцелію при невисокій активності пектиназ. Буряковий пектин, його похідні та субстрати з високим вмістом пектину сприяли продукуванню активного комплексу пектолітичних ферментів. Відмічена пряма залежність активності ендополігалактуроназ від кількості карбоксильних груп в пектинах. Важкогідролізуємі субстрати, такі як: тирса деревини, лігнін, солома та інші дозволяли отримати порівняно активні пектолітичні ферменти при одержанні різних ферментних препаратів комплексної дії.

Гриби-ксилотрофи здатні здійснювати біодеструкцію складних рослинних комплексів біополімерів, тому їх можна використовувати як субстрат для культивування грибів з метою одержання ферментних препаратів. Використання цих джерел сировини дає можливість біоконверсії багатотонажних відходів, дозволяє розширити сировинну базу мікробіологічного продукту та вирішити екологічні проблеми, пов'язані з цими відходами.

#### Розділ 5. ООБЛИВОСТІ ФЕРМЕНТНОГО ПЕКТОЛІТИЧНОГО КОМПЛЕКСУ ВИЩИХ БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ

Для характеристики пектолітичного комплексу ферментів з вищих базидіальних грибів *Coriolus hirsutus* та *Calvatia utriformis* нами дана оцінка ступеня гетерогенності та компонен-

тного складу в порівнянні з промисловим ферментним препаратом пектофоеїтидіном з *Aspergillus foetidus*. Ферментні препарати з вищих базидіальних грибів отримані спиртоосадженням з культуральних фільтратів та попередньо очищені від пігментів та баластного білка на аніоніті ФАФ, а потім з використанням гель-хроматографії на ультрагелі АСА-54 встановлені молекулярні маси відповідних ферментів пектолітичного комплексу. В препаратах з *S. hirsutus* та *S. utriformis* виявлено 3 групи білкових комплексів з активністю пектолітичних ферментів. Для *S. hirsutus* 22,2% ендopolігалактуроноазної та 38,1% екзopolігалактуроноазної активності є формами з молекулярною масою 45-50 кДа, 11% та 6,8% відповідно з молекулярною масою біля 10 кДа. Подібне розподілення цих ферментів характерне і для *S. utriformis*. Пектинестерази *S. hirsutus* мають молекулярну масу 60 кДа, *S. utriformis* має 2 форми з молекулярною масою 45 та 60 кДа. Для пектофоеїтидіна полігалактуронази та пектинестерази розподілені в 5 групах білкових піків з молекулярною масою 60, 45-50, 22 та біля 10 кДа.

При хроматографічному розділі на ДЕАЕ-целюлозі пектолітичного комплексу *S. hirsutus* виявлено 5 білкових піків, в яких показаний розподіл питомої активності пектиназ (рис. 1).

При ізофокусуванні в лінійному градієнті рН одержані відмінності у розподілі ізоелектричних точок різних ферментів пектолітичного комплексу для *S. hirsutus* та *A. foetidus*. Для *S. hirsutus* рІ зони для полігалактуронази - 5,4; 4,9; 4,4; 4,1; 3,0; 2,1; для екзopolігалактуронази - 5,4; 5,0; 3,6; 3,0; 2,2; для пектинестерази - 4,0 і 2,8. Для пектофоеїтидіну рІ зони для полігалактуронази - 5,8; 4,5; 3,4; для екзopolігалактуронази - 5,4; 5,0; 3,6; 3,0; 2,2; для пектинестерази - 6,0; 5,6; 3,0.

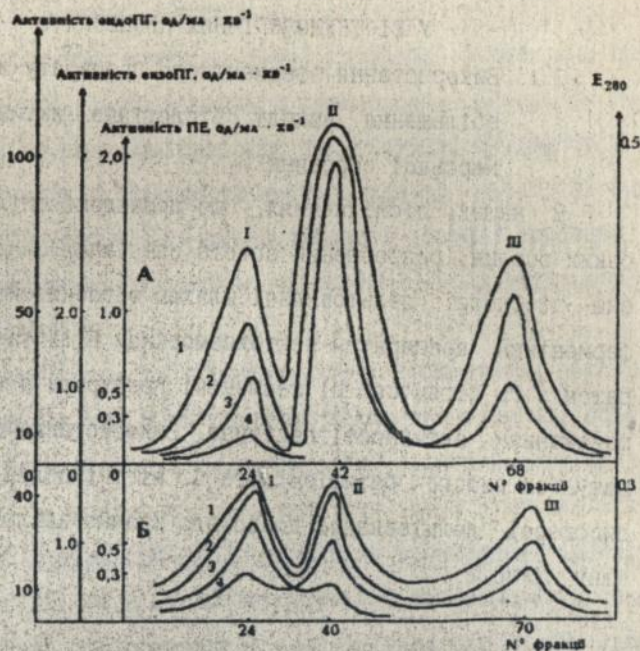


Рис. 1. Гельфільтрація на ультрагелі АСА-54 ферментних препаратів *Coriolus hirsutus* (А) та *Calvatia utriformis* (Б): 1 - розподіл білка (Е); 2 - розподіл активності полігалактуранози; 3 - розподіл активності екзополігалактуранози; 4 - розподіл активності пектинестерази

При вивченні гідролізу різних пектинів ферментними препаратами з вищого базидіоміцета *C. hirsutus* та дейтероміцета показана подібність одержаних продуктів гідролізу в обох випадках.

При вивченні деяких фізико-хімічних властивостей ферментів пектолітичного комплексу встановлені оптимуми рН та температури для окремих ферментів та їх стабільність в залежності від температури.

## Розділ 6. ФЕРМЕНТНІ ПРЕПАРАТИ З ВИЩИХ БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ У БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСАХ

### 6.1. Використання ферментного препарату з *S. hirsutus* для збільшення виходу біологічно активних речовин з лікарської сировини

В наших дослідженнях, що проведені спільно з РНДІ лікарських рослин, розроблений спосіб одержання сапогенінів з кореневищ діоскореї дельтовидної шляхом обробки сировини промисловим ферментним препаратом пектоаваморіном П10Х та ферментним препаратом з *S. hirsutus*. Ці ферментні препарати є комплексними з переважанням активності пектиназ. Використання ферментного препарату з вищого базидіоміцета *S. hirsutus* для обробки кореневищ діоскореї дельтовидної дозволяло значно збільшити вихід діосгеніну (Рис. 2.).

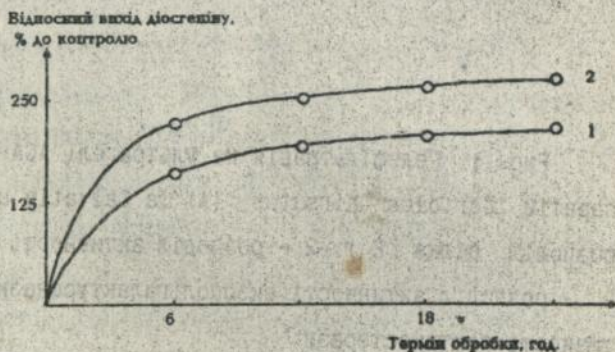


Рис. 2. Динаміка виходу діосгеніну при обробці кореневищ діоскореї дельтовидної ферментними препаратами: 1 - пектоаваморіном; 2 - препаратом з *Coriolus hirsutus*

Тонкошарова хроматографія діосгеніну свідчить, що при використанні ферментних препаратів поліпшується якість кінцевого

продукту, в ньому не виявлений побічний продукт дієн, який утворюється внаслідок розпаду діосгеніну.

Ферментацію рослин м'яти перцевої проводили ферментним препаратом з *C. hirsutus* в порівнянні з промисловим препаратом пектофостидіном. Вихід ефірної олії при використанні препарату з *C. hirsutus* на 17-20%, а препарату пектофостидіну - на 7-15% вище по відношенню до контролю без ферментативної обробки сировини.

#### 6.2. Застосування ферментних препаратів у процесах виробництва соків

В роботі проведено дослідження по дії ферментного препарату з *C. hirsutus* на вихід та технічні показники соку при обробці різних сортів винограду. Характеристика дії препарату проведена за методами технохімічного та технологічного контролю в виноробстві. Для порівняння використовували промисловий препарат пектоаваморін Г10Х, який використовується в виноробній та соковій промисловості. Дослідження проведене на 4 сортах винограду - Аліготе, Каберне, Ркацтелі, Трамінер.

Таким чином, в результаті дослідження встановлено, що при використанні ферментного препарату з вишого базидіоміцета та препаратів з дейтеромицетів при переробці винограду різних сортів можливе підвищення ефективності виробництва виноградного соку. При обробці ферментними препаратами з вищих базидіоміцетів в одержаному соці збільшується, в основному, вміст фенольних сполук, вихід соку та швидкість фільтрації, а також зменшується вміст суспензії.

Результати експериментальних досліджень з різними типами рослинних субстратів показують, що вищі базидіальні гриби є перспективними продуцентами ферментних препаратів для біотехнологічних процесів переробки сировини з метою одержання різних продуктів і біологічно активних речовин.

## ВИСНОВКИ

1. Проведено порівняльне вивчення динаміки активності пектолітичних ферментів 123 штамів 68 видів вищих базидіальних грибів, які відносяться до порядків Boletales, Agaricales, Aphyllophorales, Russulales та групи порядків Gasteromycetes. Серед досліджених вищих базидіоміцетів найбільш активним продукуванням цих ферментів характеризуються представники родин Polyporaceae порядку Aphyllophorales та Tricholomataseae порядку Agaricales.

2. Активні продуценти пектолітичних ферментів відносяться до ксилотрофів, що руйнують деревину за корозійним та деструктивними типами. Сапротрофи продукують менш активний комплекс пектолітичних ферментів. Активність цих ферментів у мікоризних грибів слідова.

3. Гриби, що руйнують деревину за корозійним типом, продукують більш активний гідролітичний комплекс пектолітичних ферментів порівняно з грибами-руйнівниками деревини за деструктивним типом.

4. На обраних нами модельних об'єктах *Coriolus hirsutus* та *Calvatia utriformis* вперше показана біохімічна складність комплексу вищих базидіальних грибів, який представлений множинними молекулярними формами полігалактуроназ та пектинестераз. Вони розрізняються за молекулярними масами, співвідношенням білкових комплексів, питомою активністю та ізоелектричними точками. Доведено, що при загальній подібності до пектолітичного комплексу дейтеромицетів, пектинази базидіоміцетів характеризуються більшою кількістю множинних форм полігалактуроназ та меншим спектром пектинестераз.

5. Встановлені фізико-хімічні властивості пектолітичних ферментів вищих базидіальних грибів за показниками  $pH_{opt.}$   $pH_{ст.}$

$t^{\circ}C_{opt}$ ,  $t^{\circ}C_{ст}$  для активних продуцентів, зокрема *Coriolus hirsutus*, які є вихідними й визначально-регламентуючими для використання в біотехнології.

6. Відібрані штами вищих базидіоміцетів, такі як *Coriolus hirsutus*, *C. versicolor*, *Irpex lacteus*, *Funalia trogii*, *Pleurotus ostreatus*, які мають високу біотехнологічну спроможність для повної біоконверсії лігноцелюлозних субстратів з метою одержання ферментних препаратів і збагачених білком кормів. Вперше використані відходи виробництва, зокрема гідролізний лігнін, гідрол. агрімус тощо, як ефективні субстрати для вищих базидіальних грибів.

7. Вперше розроблені технологічні способи обробки рослинної лікарської сировини ферментними препаратами з базидіального гриба *Coriolus hirsutus*, які дозволяють збільшити до 50% вихід діосгеніну з кореневищ діоскореї дельтовидної і на 30% вихід ефірної олії з листя м'яти перцевої та покращити якість кінцевого продукту.

#### СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г., Трутнева И.А. Ферментные системы высших базидиомицетов. - Киев: Наук. думка, 1989. - 280 с.

Трутнева І.А., Панасенко Т.В. Порівняльне вивчення деяких гідролітичних ферментів у *Agaricus silvestris* (Sch. et Fr.), *Coriolus pubescens* (Fr.) Quel., *Aspergillus niger* (van Tiegh.) / Мікробіол. журн. - 1977. - 39, вип. 4. - С. 501.

Дудченко Л.Г., Трутнева І.А., Панасенко Т.В. Пектолітична активність грибів роду *Coriolus* Quel. у культурі // Укр. ботан. журн. - 1978. - 35, № 1. - С. 66-70.

Трутнева І.А., Дудченко Л.Г. Дослідження активності позаклітинних ендополігалактуроаз агарикальних грибів у культурі

//Укр. ботан. журн. -1978. -35, N.6. - С.625-628.

Трутнева І.А., Дудченко Л.Г. Пектолітичні ферменти грибів порядку *Arhyllorphogales*// Укр. ботан. журн. -1984. -41, N.5. -С.64-67.

Дудченко Л.Г., Трутнева І.А. Пектолітична активність гастроіцетальних грибів у культурі//Там же. -1985. -42, N.1. -С.45-48.

Дудченко Л.Г., Трутнева І.А. Пектолітичні ферменти базидіального гриба *Coriolus rubescens* у культурі// Там же. -1985. -42, N.2. -С.38-40.

Семичаевский В.Д., Трутнева И.А., Портнова Л.В. Культивирование высших дереворазрушающих базидиомицетов на лигноцеллюлозных отходах //Превращения древесины при энзиматическом и микробиологическом воздействиях. - Рига: Зинатне, 1985. - С. 167-173.

А.с. СССР N.1068477, МКИ С 12 N9/02, Способ получения комплекса ферментов/ Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Мельничук Г.Г., Яковенко В.В., Трутнева И.А., Дудченко Л.Г. -Опубл. 23.01.1984, Б.И. N.3

А.с. СССР N.1084299, МКИ С 12, 9/02, С 12 1/14. Способ получения комплекса внеклеточных ферментов / Семичаевский В.Д., Даниляк Н.И., Трутнева И.А. - Опубл. 07.04.1984. - Б.И. N.13.

А.с. СССР N.1156695, МКИ Ф 61 К 35/78, С 07 7/022. Способ получения сапогенинов/ Сытник К.М., Даниляк Н.И., Дудченко Л.Г., Фонин В.С., Трутнева И.А. -Опубл. 23.05.1985. -Б.И. N.10.

Трутнева И.А. Изучение комплекса пектолитических ферментов у представителей высших базидиальных и плесневых грибов//УІ конф. молод. ученых-ботаников Украины: Материалы конф. (Киев, февр. 1979 г.) -Киев: Наук. думка, -1979. -С.212-214.

Трутнева И.А. Изучение ферментов пектолитического комплекса у базидиомицетов //Там же. - С. 214-215.

Дудченко Л.Г., Трутнева И.А. Характеристика пектолитическо-

го комплекса ферментов различных таксонов высших базидиальных грибов//VIII съезд Украин. ботан. о-ва: Тез. докл. - Киев: Наук. думка, 1982. - С. 351-352.

Дудченко Л. Г., Трутнева И. А., Галузинская Н. С., Елько А. И. Особенности пектолитического комплекса ферментов высших базидиальных грибов//Мицелиальные грибы (физиология, биохимия, биотехнология): Тез. докл. Всесоюз. конф. "Мицелиальные грибы (Пушино, 10-12 окт. 1983 г.). - Пушино: Наука, 1983. - С. 127-128.

Дудченко Л. Г., Трутнева И. А., Галузинская Н. С., Елько А. И. Влияние условий культивирования базидиальных грибов на активность пектолитических ферментов//Там же. - С. 139-140.

Дудченко Л. Г., Трутнева И. А., Фонин В. С. Об использовании полиферментных систем высших базидиальных грибов для гидролиза растительного сырья// Там же. - С. 126-127.

Дудченко Л. Г., Трутнева И. А. Съедобные агарикальные грибы - источник внеклеточных пектолитических ферментов//Производство высших съедобных грибов в СССР: Тез. докл. II Всесоюз. сов. (Чернигов, 23-28 мая 1985 г.). - Киев: Наук. думка, 1985. - С. 25-28.

Trutneva I. A., Dudchenko L. G. Peculiarities of pectolytic enzymes of higher Basidiomycetes // Xth Congr. of Europ. Mycol. - Tallinn, Estonian SSR, Aug., 1989: Abst. - Tallinn, 1989. - P. 123.

Трутнева И. А. Экстрацеллюлярные и связанные с мицелием пектолитические ферменты высших базидиальных грибов// Биосинтез целлюлозы и других компонентов клеточной стенки: Тез. докл. III Всесоюз. конф. - Казань, 1990. - С. 136.

Трутнева И. А. Пектолитические ферменты высших базидиомицетов. Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.24 - Микология. Институт ботаники им. Н. Г. Холодного. Национальная академия наук Украины, Киев, 1995.

Изучение около 120 штаммов грибов из порядков Agaricales,

Boletales, Russulales, Aphyllophorales, группы порядков Gasteromycetes показало, что большинство из них продуцирует активный комплекс пектолитических ферментов. Соотношение активностей пектолитических ферментов и потенциальная способность высших базидиомицетов к их продуцированию определяется систематической и экологической принадлежностью изучаемых грибов. Микоризные грибы характеризуются медленным накоплением биомассы и низкими активностями пектолитических ферментов. У напочвенных сапротрофов отмечено более быстрое накопление биомассы и выше уровень активности пектолитических ферментов. Быстрое накопление биомассы и высокий уровень активности пектолитических ферментов характерен для ксилотрофов. Среди этой группы грибов отобраны возможные продуценты пектолитических ферментов. Важным фактором для продуцирования пектиназ является состав питательной среды. Сложные источники углерода и лигноцеллюлозные отходы могут быть использованы для выращивания грибов и продуцирования пектолитических ферментов. Для исследования специфики ферментного комплекса высших базидиальных грибов выделен и очищен ферментный препарат из *Coriolus hirsutus* и *Calvatia utriformis*. Дана сравнительная оценка гетерогенности пектолитических ферментных систем данных высших базидиомицетов и известного продуцента *Aspergillus foetidus*. С использованием гель-хроматографии на ультрагеле АСА-54 белков-маркеров и исследуемых ферментных препаратов были установлены молекулярные массы изучаемых пектиназ. Аналитическое изофокусирование этих ферментных препаратов в линейном градиенте pH выявило различия зон рI, отвечающих полигалактуроназной, экзополигалактуроназной и пектинэстеразной активностям. Эти данные свидетельствуют о многокомпонентности пектолитических ферментов у изучаемых высших базидиомицетов и значительном сходстве с таковыми у дейтеромицетов. При обработке

этим ферментными препаратами лекарственного сырья с целью интенсификации выхода биологически активных веществ, препарат из *C. hirsutus* способствовал увеличению выхода продукта, а также улучшению качества полученного продукта.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ВИЩІ БАЗИДІАЛЬНІ ГРИБИ, ФЕРМЕНТНІ СИСТЕМИ, ПЕКТОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ.

Trutneva I.A. Pectolytic enzymes of higher Basidiomycete Ph.D. thesis. Speciality 03.00.24-Mycology. Institute of Botany by M.G.Cholodny. National Academy of Sciences of the Ukraine. Kiev, 1995.

The studies of over 120 strains of fungi from Agaricales, Boletales, Russulales, Aphyllophorales and Gasteromycetes have shown that most of them possess an active complex of pectolytic enzymes. The ratio of activities in pectolytic enzymes and potential capacity of Higher Basidiomycetes to their production is mainly determined by the species and strain attribution as well as by ecological confinement of the fungi studied. Besides their slow growth, mycorrhizal fungi are shown to be characterized by slight manifestation of extracellular pectinases. More considerable accumulation of biomass and the level of pectolytic activity were typical of soil saprotrophs. Rapid accumulation of biomass and a high level of pectolytic enzymes were peculiar to wood-rotting saprotrophs. A crucial factor in pectinase production is the composition of the medium. Mixed carbon sources and lignocellulose wastes can be used to grow for fungi and production pectic enzymes. In order to study the specificity of the enzymic complex of Higher Basidiomycetes the enzymic preparation from *Coriolus hirsutus* and *Calvatia utriformis* were isolated and purified. Heterogeneity of pectolytic enzymic systems of Higher

Basidiomycetes and *Aspergillus foetidus* was estimated in comparison. Molecular weights of the pectinases were established using gel chromatography on ACA-54 ultragel of protein-markers and the enzymic preparations under study. The analytical isofocusing of this enzymic preparations in the linear pH gradient has revealed differences in pI zones responding to the polygalacturonase, exopolygalacturonase and pectinesterase activities. These data indicate the multicomponent nature of pectinolytic enzymes in the studied Higher Basidiomycetes and considerable similarity with those of Deuteromycetes. When treating medicine substrate with these enzymes in order to intensify the yield of biologically active substances, the preparation from *C. hirsutus* favours an increase in the yield of product and improves the quality of the product.

412869

AB 33.045