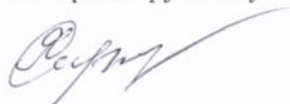


НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут ботаніки ім. М.Г.Холодного

На правах рукопису



АГУЖЕН

Яна Геннадіївна

**ВИЩІ БАЗИДИОМІЦЕТИ - ПРОДУЦЕНТИ
ТРОМБОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ**

03.00.24 - мікологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ - 1997



Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фізіології рослин Донецького державного університету.

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

Офіційні опоненти - Лауреат державної премії,
доктор біологічних наук
Соломко Ельвіра Федорівна
доктор біологічних наук,
професор Харченко Світлана Миколаївна.

Провідна організація - Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д.К.Заболотного НАН України

Захист відбудеться "2" квітня р. о 10 год. на
засіданні спеціалізованої вченої ради Д 50.06.01 в Інституті ботаніки
ім М.Г.Холодного НАН України за адресою: 252601, Київ - 4, вул.
Терещенківська, 2.

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

Автореферат розісланий "26" лютого 1997р.

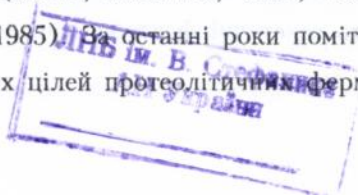
Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Ільїнська А.П.

ВСТУП

Актуальність теми. Охорона та раціональне використання природних ресурсів, збереження генофонду та біологічної різноманітності, пошук нових об'єктів біотехнології для одержання харчових продуктів та цінних медичних препаратів - це найактуальніші проблеми сучасної біології, вирішення яких має сприяти прогресивному розвитку вітчизняної науки. Гриби, і зокрема макроміцети, як складова частина природних біологічних систем, постають зараз важливим об'єктом теоретичних та прикладних досліджень. Вивчення ферментних систем вищих базидіоміцетів, що відіграють важливу роль у процесах біодеструкції рослинних матеріалів, ведеться у двох основних напрямках. Перший - пізнання фундаментальних процесів перетворення речовин у природі та розробка хемотаксономічних систем ідентифікації грибів (Дудка, Вассер, 1980; Денисова, 1991; Даниляк и др., 1989); другий - використання вищих грибів у біотехнологічних процесах як продуцентів різноманітних метаболітів (Соломко, Дудка, 1985; Бухало, 1988; Денисова, 1991; Белова, 1991; Псурцева и др., 1994; Lamaison, 1976; Kawai, 1973; Musilek, 1981).

Вибір базидіальних грибів як джерела протеїназ тромболітичної дії пов'язаний з запитом практичної охорони здоров'я. Незважаючи на те, що сучасна медицина має великі можливості щодо запобігання та лікування тромбозів, існує ще досить багато невирішених проблем (Чазов, Лакин, 1977; Бокарев, 1992; Братчик, 1993). Внаслідок активного пошуку тромболітиків серед різних груп організмів зараз активно використовуються продукти мікробного синтезу, препарати, що отримують з донорської крові, з медичних п'явок (Шатаева, Заикина, 1975; Демина, Лысенко, 1991; Баскова, 1995; Matsueda, 1985; Chenetal, 1985). За останні роки помітно інтенсифікувалося вивчення для цих цілей протеолітичних ферментів



грибів (Денисова, 1981, 1982, 1987, 1991; Фалипа, 1980; Петрищев, Денисова, 1992). Однак, даними дослідженнями охоплена хоч і численна, але досить вузька група організмів.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідження протсолітичних ферментів базидіоміцетів фібринолітичної, гемолітичної, казеїнолітичної та тромболітичної дії; вивчення закономірностей успадкування фібринолітичної активності, особливостей синтезу протеїназ тромболітичної дії та можливості їх використання для отримання лікарських препаратів. При цьому були поставлені такі завдання:

- встановити наявність фібринолітичної, гемолітичної, казеїнолітичної та тромболітичної активності у базидіальних грибів з різних систематичних груп;
- виявити особливості успадкування фібринолітичної активності;
- з'ясувати вплив умов культивування на біосинтез тромболітичних ферментів;
- дослідити особливості динаміки синтезу тромболітичних ферментів;
- отримати ферментні препарати найбільш активних продуцентів та вивчити їх фізико-хімічні властивості.

Основні положення, що виносяться на захист:

(- в рамках окремих систематичних груп грибів (рід, вид) відмічено великий діапазон коливань фібринолітичної, гемолітичної, казеїнолітичної та тромболітичної активностей;

- на фібринолітичну активність монокаріонів *Coriulus versicolor* (L.ex Fr.) Quel. та *Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.) Sing. адитивно впливають генетичні фактори сумісності, причому, домінує пшичий показник активності;

- незалежно від умов культивування ($t^{\circ}\text{C}$, рН, склад живильного середовища) максимальна тромболітична активність спостерігається в період експоненціального росту культур;

- висока тромболітична активність та відсутність токсичної дії визначають перспективність відібраних культур *Amyloporia lenis* (Karst.) Bond. et Sing. та *Tyromyces revolutus* (Bres.) Bond. et Sing. як продуцентів тромболітичних ферментів.

Наукова новизна. Проведено порівняльне дослідження фібринолітичної, гемолітичної, казеїнолітичної, тромболітичної активності у 191 штаму 80 видів вищих базидіоміцетів з порядків *Tricholomatales*, *Agaricales*, *Aphylllophorales*, *Aporpiales*, серед яких 80% складають маловивчені афілофоральні гриби - ксилотрофи штучних і природних насаджень Донбасу. Вперше під час вивчення залежності рівня фібринолітичної активності від генетичного статусу культури встановлено, що фактори сумісності адитивно впливають на показник активності. Отримані відсутні раніше дані про розподіл протеолітичної активності вищих базидіоміцетів у відношенні до різноманітних білкових субстратів є перспективними для хемотаксономії грибів досліджених порядків. У ряду найактивніших видів вперше досліджена залежність між рівнем синтезу тромболітичних ферментів, накопиченням біомаси та умовами культивування. Встановлено, що синтез тромболітичних ферментів має два піки, і що основна маса тромболітичного ферментного комплексу виділяється в культуральне середовище. Вперше з культуральної рідини грибів *Ceriporia subpudorina* (Pil.) Bond., *Tyromyces revolutus* (Bres.) Bond. et Sing., *Amyloporia lenis* (Karst.) Bond. et Sing., *Irpex foliaceo-dentatus* Nic., *Hapalopilus nidulans* (Fr.) Karst., *Corticium roseum* Pers., *Phellinus igniarius* (L. ex Fr.) Quel. виділені ферментні препарати тромболітичної дії, які мають декілька оптимумів

pH-дії та відносяться до числа термолабільних. Визначена наявність подібних білкових фракцій для ферментних препаратів, одержаних з культуральних фільтратів вказаних продуцентів.

Практична цінність роботи. Відібрано ряд перспективних культур як активних продуцентів тромболітичних ферментів, серед яких *Corticium roseum* шт.М-20, *Tyromyces revolutus* шт.ВТ-92, *Irpex foliaceo-dentatus* шт.Т-31 та ін. Для препаратів, отриманих з грибів *Amyloporia lenis* та *Tyromyces revolutus*, встановлена відсутність токсичності, що створює можливість подальшого їх використання у медицині. Депонований у колекцію чистих культур Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України штам KB-92 гриба *Amyloporia lenis* є перспективним для отримання нового тромболітичного препарату.

Апробація роботи та публікації. Основні положення дисертаційної роботи викладались на конференції молодих вчених "Актуальні проблеми фізіології рослин та генетики" (Київ, 1996), наукових конференціях ДонДУ (Донецьк, 1993-1995); Всукраїнських студентських конференціях (Донецьк, 1992-1995).

У завершеному варіанті дисертація доповідалась на засіданнях кафедри фізіології рослин ДонДУ та відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України.

За матеріалами дисертації опубліковано 13 робіт.

Структура і обсяг роботи. Дисертація викладена на 176 сторінках та складається із вступу, 5 розділів, обговорення результатів, висновків, списку літератури, додатку; ілюстрована 26 таблицями та 51 малюнком. Бібліографічний покажчик містить 304 джерела, в тому числі 110 - іноземних авторів.

Розділ 1. ПРОТЕОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ ВИЩИХ БАЗИДИОМІЦЕТІВ (Огляд літератури)

За останні роки значно розширилися дослідження культур вищих базидіальних грибів для біотехнологічних цілей (Дудка, Васер, Бухало, 1978; Соломко, 1985; Соломко, Дудка, 1985; Беккер, 1988; Бухало, 1988; Даниляк и др, 1989; Безбородов, 1991; Псурцева и др., 1994; Lamaison, 1976; Musilec, 1981). Основна сфера їх використання - одержання харчових та кормових продуктів (Бухало, 1988; Rajarathnam, 1992). Поряд з цим, володіючи потужними ферментними комплексами (целюлаза, ксиланаза, пектиназа, протсаза, декарбоксилаза, лігніназа та ін.), здатними до розкладу всіх компонентів рослинного субстрату, дереворуйнівні базидіомицети відкривають нові перспективи для їх використання. Так, ці гриби дозволяють отримувати різноманітні цінні технічні та очищені ферментні препарати для потреб сільського господарства, харчової та легкої промисловості, медицини (Денисова, 1982, 1990; Семичаевский и др., 1984; Бойко, Негруцкий, 1985, 1989; Соломко, Дудка, 1985; Гандбаров и др., 1986; Musilec, 1981). Особливу увагу дослідників привертають протеїнази базидіомицетів, які у порівнянні з протеолітичними ферментами нижчих грибів вивчені недостатньо. Одною з найважливіших категорій протеолітичних ферментів у зв'язку з їх медичним призначенням є фібринолітичні ензими. Всі відомі в наш час мікробні протеази прямої тромболітичної дії, які виділені і досліджені *in vivo*, руйнують не лише фібрин, а й інші білки плазми крові. Вони токсичні, бо, розщеплюючи фібрин, утворюють речовини, що мають шкідливий вплив на організм людини. Це обумовило подальший пошук нових перспективних організмів, що виробляють ферменти тромболітичної та фібринолітичної дії для медичних цілей, зокрема, серед вищих базидіальних грибів (Фалина, 1970;

Фалина и др., 1978; Денисова и др., 1980; Петрищев, Денисова, 1994; Elo et al., 1953; Veselsky, 1960).

Розділ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження був 191 штаб 80 видів базидіоміцетів з порядків *Tricholomatales*, *Agaricales*, *Aphyllphorales* та *Aporpiales*. Гриби з порядків *Tricholomatales* та *Agaricales* розташовані відповідно до класифікаційної схеми, прийнятої у "Визначнику грибів України" (Зерова, 1979). Афілофоральні гриби розташовані відповідно до системи трутових грибів М.А.Бондарцевої (1983) та В.Юліха (Julich, 1984). У роботі використовувались чисті культури, виділені з плодових тіл на кафедрі фізіології рослин ДонДУ.

Чисті культури базидіоміцетів вирощували поверхнево при температурі 26°C на сусло-агарі, сусло-пептонному середовищі, середовищі Норкранс (Бухало, 1988), на глюкозо-пептонному середовищі (Маттисон, Фалина, 1973).

Фібринолітичну активність (ФА) визначали за методом Аструпа і Мюллєртца (Astrup, Mullerts, 1952), гемолітичну активність (ГА) - за ступенем просвітлення кров'яного агару (Егоров и др., 1971; Методы..., 1982), казеїнолітичну активність (КА) - за ступенем просвітлення молочного агару під час росту грибів (Касаткіна и др., 1969; Егоров и др., 1971; Методы..., 1982; Venables, Watkinson, 1989; Klan, Baudisova, 1990), тромболітичну активність (ТА) визначали за методом Імшенецького і Броцької (1969). Вміст білку визначали за методом Бредфорда (Bredford, 1976). Ферментні препарати отримували фракціонуванням сульфатом амонію (Броповицкая, Горетов, 1967). Електрофоретичний розділ білків проводили в паралельних пластинках у поліакриламідному гелі (Сафонов, Сафонова,

1969; Сафонов, Сафонова, 1971; Маурер, 1971) у приладі конструкції К.А.Трувеллера та Г.Н.Нефедова (1974).

Отримані результати статистично оброблені за загальноприйнятими методиками (Адлер, Маркова, 1976; Лисенков, 1979; Лакин, 1980; Максимов, 1980; Методические указания, 1992).

Розділ 3. ПОШУК МОЖЛИВИХ ПРОДУЦЕНТІВ ПРОТЕЇНАЗ МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ СЕРЕД ВИЩИХ БАЗИДИОМІЦЕТІВ

Під час дослідження 191 штаму 80 видів базидіальних грибів штучних і природних насаджень Донбасу встановлені показники фібринолітичної, гемолітичної, казеїнолітичної активностей при культивуванні на агаризованих середовищах. Різні рівні ФА відмічені у переважної більшості культур дереворуйнівних базидіомицетів (99%). Причому, найактивніші штами (ФА більше 900 мм²) становлять 16.2% від числа досліджуваних культур. Серед грибів порядків *Tricholomatales* та *Agaricales*, що належать до групи порядків пластинчастих грибів, пайбільш активні продуценти належать до видів *Panus tigrinus*, *Lentinus vulpinus*, *Flammulina velutipes*, *Oudemansiella mucida*, *Tricholoma portentosum*, *Agaricus campestris*, *Pholiota adiposa*. Серед афілофоральних грибів активними продуцентами фібринолітичних ферментів є штами грибів *Corticium roseum*, *Schizophyllum commune*, *Hapalopilus albo-luteus*, *Irpex lacteus*, *Amyloporia lenis*, *Lenzites betulina*, *Hirschioporus alba*, *H.vaginata*, *Piptoporus betulinus*, *Sparassis laminosa*, *Aporpium canescens*. Гриби з високими значеннями ФА знаходились в родинях *Schizophyllaceae*, *Polyporaceae* (підродина *Tyromycetoideae* і *Trametoideae*).

Під час дослідження залежності ФА від генетичного статусу на прикладі штама МН-10 гриба *Oudemansiella mucida* (Schrad.:Fr.) Hoehn.; штама КТ гриба *Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.) Sing.; штама ЗБ-3 гриба *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel.; штама D-118 гриба *Sparassis laminosa* Fr. встановлена значна внутріштамова дисперсія показників ФА. Дисперсійний аналіз результатів показав наявність вірогідних відмін між монокаріотичними культурами, що отримані від одного батьківського штаму. Аналіз ФА монокаріотів тетраполярних видів *Flammulina velutipes* і *Coriolus versicolor*, об'єднаних в групи з однаковими аелями сумісності (рис.1-2) показав наявність вірогідних відмін лише між A_1B_1 та A_2B_2 генотипами. Порівняння груп монокаріотів, об'єднаних за ознакою загального А чи В фактору виявило, що не існує вірогідних відмін щодо ФА між A_1 та A_2 , а також між B_1 та B_2 групами, що свідчить про адитивний вплив факторів сумісності на дащу ознаку. Причому в цих випадках домішує нижчий показник. Шляхом схрещення монокаріотів вказаних грибів отримані дікаріотичні культури. Порівняльний аналіз ФА моно- та дікаріотичних культур показав відсутність вірогідних відмін між середніми показниками монокаріотів та дікаріотів. Монокаріоти можна вважати відправною базою для проведення селекційної роботи, а визначення аельної конституції гриба за факторами сумісності є важливим для отримання культур, стабільних за ознакою високої ФА.

Дослідження гемолітичних властивостей базидіоміцетів з'ясувало значні коливання рівня ГА. При порівнянні отриманих значень з ГА нижчих грибів (Егоров и др., 1971; 1979) встановлено, що базидіоміцети менш здатні розчиняти еритроцити. Відсутність кореляції між ФА і ГА дозволяє говорити про перспективність вищих базидіоміцетів як продуцентів ферментних комплексів медично-

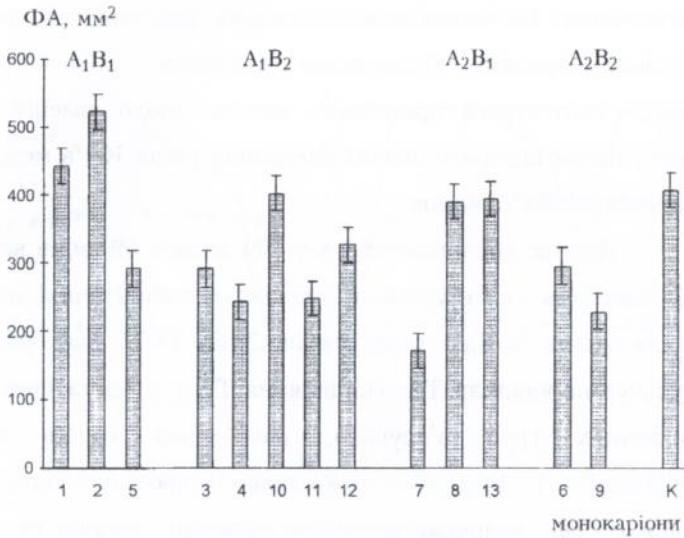


Рис. 1. Фібринолітична активність монокаріонів гриба *Coriolus versicolor*, К - ФА батьківського штаму ЗБ-3

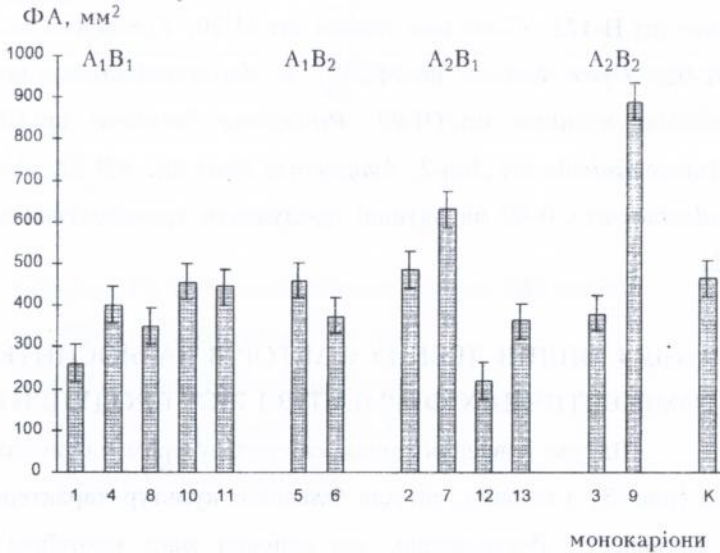


Рис. 2. Фібринолітична активність монокаріонів гриба *Flammulina velutipes*, К - ФА батьківського штаму КТ

го призначення. Вивчення казеїнолітичних властивостей грибів досліджуваних порядків підтвердило здатність цієї групи організмів синтезувати протеїнази, активні щодо казеїну молока. Причому, також відмічені значні коливання рівня КА в межах окремих систематичних одиниць.

Під час дослідження ТА у 109 штамів 69 видів встановлено, що здатність синтезувати протеїнази тромболітичної дії характерна для вищих базидіальних грибів. Лише 14.7% експериментальних культур не виявили ТА. Порівняння ТА у представників різних систематичних груп з'ясувало, що серед грибів порядків *Tricholomatales* і *Agaricales* особливий інтерес викликає родина *Tricholomataceae* великою кількістю активних штамів та високим рівнем ТА. З афілофоральних грибів відібрані культури *Phellinus igniarius* шт.В-050, *Steccherinum ochraceum* шт.ВР-92, *Inonotus obliquus* шт.Н-172, *Corticium roseum* шт.М-20, *Tyromyces revolutus* шт.ВТ-92, *Irpex lacteus* шт.М-253, *I. foliaceo-dentatus* шт.Т-31, *Hapalopilus nidulans* шт.ТЧ-02, *Piptoporus betulinus* шт.ББК-93, *Fomitopsis pinicola* шт.Лип-2, *Amyloporia lenis* шт. КВ-92, *Ceriporia subpudorina* шт.СВ-09 як активні продуценти тромболітичних ферментів.

Розділ 4. ВПЛИВ ДЕЯКИХ ФАКТОРІВ НА БІОСИНТЕЗ ТРОМБОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ І РІСТ ПРОДУЦЕНТІВ

Під час вивчення динаміки синтезу тромболітичних ферментів (рис. 3) з'ясовано, що для більшості культур характерно два піки активності. Встановлено, що основна маса протеїназ тромболітичної дії виділяється в культуральну рідину під час активного росту грибів. Визначення максимальної швидкості росту та синтезу ферментів у експоненціальній фазі росту показало, що для

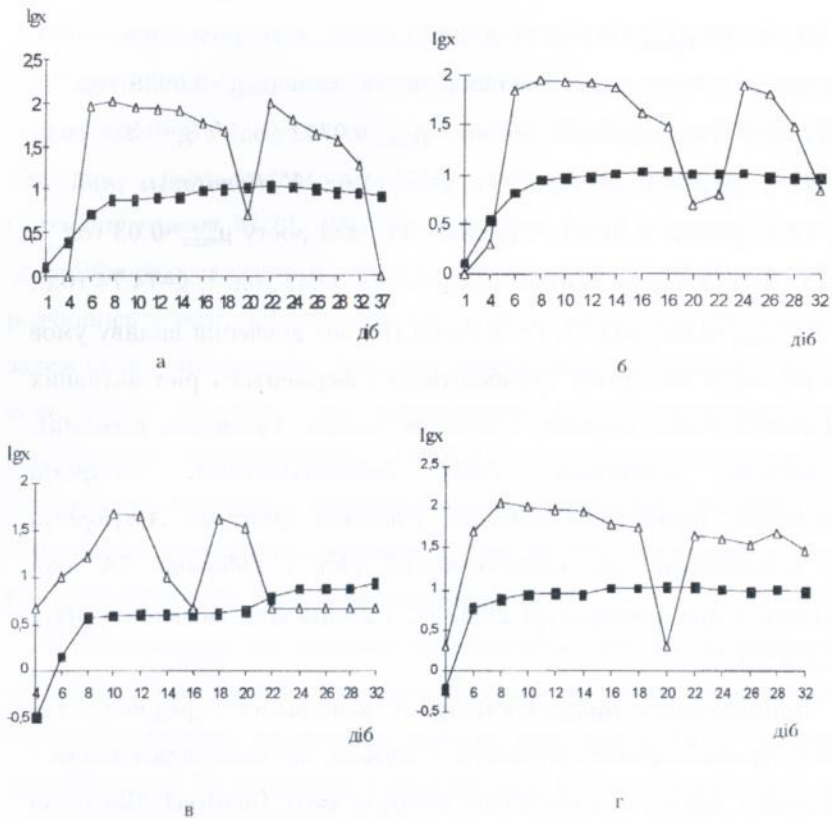


Рис. 3. Динаміка ТА (Δ) і накопичення біомаси (\blacksquare) штамів:

а - ТЧ-02 (*Naralopilus nidulans*);

б - Т-31 (*Irpex foliaceo-dentatus*);

в - Лип-2 (*Fomitopsis pinicola*);

г - К-201 (*Panus tigrinus*)

Hapalopilus nidulans максимальна швидкість синтезу тромболітичних ферментів μ_{\max} ТА дорівнює 0.011 год.⁻¹, а час подвоєння показника ТА $g=7.38$ год.; для накопичення біомаси $\mu_{\max}=0.0938$ год.⁻¹ а $g=63$ год. У *Irpex foliaceo-dentatus* μ_{\max} 0.0742 год.⁻¹, $g=9.336$ год., для росту $\mu_{\max}=0.0128$ год.⁻¹, а $g=54.14$ год. У *Fomitopsis pinicola* μ_{\max} ТА дорівнює 0.01 год.⁻¹, $g=69.3$ год., для росту $\mu_{\max}=0.03$ год.⁻¹, а $g=23.1$ год. У *Panus tigrinus* μ_{\max} росту - 0.047 год.⁻¹, $g=14.74$ год., для ТА $\mu_{\max}=0.067$ год.⁻¹, $g=10.34$ год. Під час вивчення впливу умов культивування на синтез тромболітичних ферментів і ріст активних продуцентів *Panus tigrinus*, *Corticium roseum*, *Tyromyces revolutus*, *Steccherinum ochraceum*, *Irpex foliaceo-dentatus*, *Ceriporia subpudorina*, *Hapalopilus nidulans*, *Phellinus igniarius*, *Amyloporia lenis* встановлено, що найактивніший ріст і найвища ТА спостерігається при температурі 28-32 °С і початкових значеннях рН у межах 3.5-4.5.

Випробування придатності трьох живильних середовищ для синтезу тромболітичних ферментів з'ясувало, що найпридатнішими є середовища, що містять органічне джерело азоту (пептон). Вивчення індукції протсолітичної активності гриба *Amyloporia lenis* шт.КВ-92 джерелами азоту, вуглецю та сірки виявило, що синтез протеїназ йде тільки за наявності органічного азоту. Стимулюючої дії джерел вуглецю та сірки на біосинтез не встановлено. При використанні різноманітних джерел вуглецю з'ясовано, що досліджувані гриби добре ростуть та синтезують тромболітичні ферменти різної активності на всіх досліджених сполуках.

Розділ 5. ОТРИМАННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ ТРОМБОЛІТИЧНОЇ ДІЇ

Ферментні препарати семи найактивніших грибів *Ceriporia subpudorina* СВ-09, *Tyromyces revolutus* ВТ-92, *Amyloporia lenis* КВ-92, *Irpex foliaceo-dentatus* Т-31, *Hapalopilus nidulans* ТЧ-02, *Corticium roseum* М-20, *Phellinus igniarius* В-050 отримані шляхом фракційного осадження білків сульфатом амонію. Вони мають добру розчинність у воді, забарвлення від світло-кремового до коричневого залежно від продуцента. Для цих ферментних препаратів ТА, що виявлена у фракціях, які відповідають 40-80% насичення, при відповідних концентраціях (>0.5%) перевищує активність лікарського препарату фібринолізину. Максимальні значення ТА відмічені у препаратів, одержаних при 60-80% насиченні культуральних фільтратів сірчаноокислим амонієм.

Встановлено, що отримані тромболітичні препарати виявляють активність плазмінової, а не активаторної дії. Вони не термостабільні і їх термічна денатурація настає вже при 50-70 °С залежно від препарату. Ці препарати є комплексами ферментів з різними оптимумами рН-дії. Дистильована вода або фізіологічний розчин по-різному впливають на активність ферментних препаратів залежно від продуцента, що можна пояснити інгібуючою дією іонів хлору чи натрію на білки.

Методом електрофорезу в поліакриламідному гелі встановлено наявність у всіх отриманих препаратах білків з однаковою електрофоретичною рухливістю. При порівнянні фракцій, одержаних при різному насиченні сульфатом амонію культуральної рідини гриба *Amyloporia lenis* КВ-92 найбільше число спільних білків відмічено для фракцій 50 і 60%, для 60% і 70%. А найбільша кількість спільних фракцій з фібринолізином відмічена у ферментних препаратів,

які були отримані при 50% і 60% насиченні (рис. 4). Порівняльний аналіз даних електрофорезу препаратів, отриманих з різних продуцентів (рис. 5) показав наявність значної кількості спільних фракцій. Для всіх препаратів, за винятком ферментного комплексу *Corticium roseum* M-20, встановлені спільні фракції з фібринолізмом, що може свідчити про наявність не тільки спільних функціональних рис, а й схожості в побудові білкових молекул грибів і тварин.

Ферментні препарати з *Amyloporia lenis*, *Tyromyces revolutus* пройшли токсикологічні випробування. Встановлено, що препарати-ферментів, відповідно до класифікації гідролітичних ферментних препаратів мікробіологічного синтезу, належать до малонебезпечних (4 клас), або до таких, що не викликають будь-яких ознак інтоксикації. Це дозволяє продовжити дослідження названих ферментних комплексів, вивчення їх властивостей, відпрацювання технології одержання цих препаратів з високим ступенем очищення.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Таким чином, проведені дослідження показують перспективність пошуку активних продуцентів тромболітичних ферментів серед вищих базидіальних грибів. Відібрані штами з високою протеолітичною активністю можуть бути використані в біотехнології, тому що дереворуйнівні базидіоміцети є непатогенними для людини, характеризуються відсутністю спорношення в культурі і здатністю досить швидко зростати на дешевих та доступних живильних середовищах. Отримані результати дозволяють рекомендувати дослідні культури вищих афілофоральних грибів як продуцентів тромболітичних ферментних комплексів для широкомасштабного вивчення і отримання медичних препаратів.

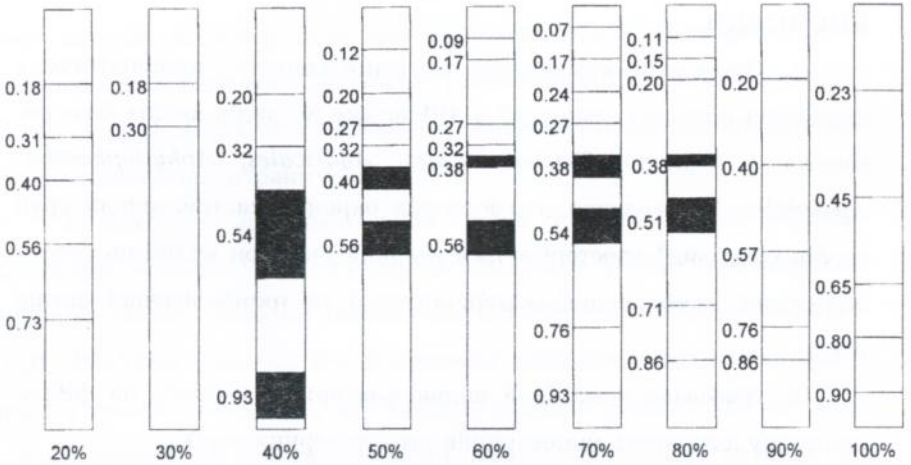


Рис. 4. Схема електрофореграм фракцій тромболітичного препарату гриба *Amylporia lenis* KB-92, отриманих при різному насиченні сульфатом амонію

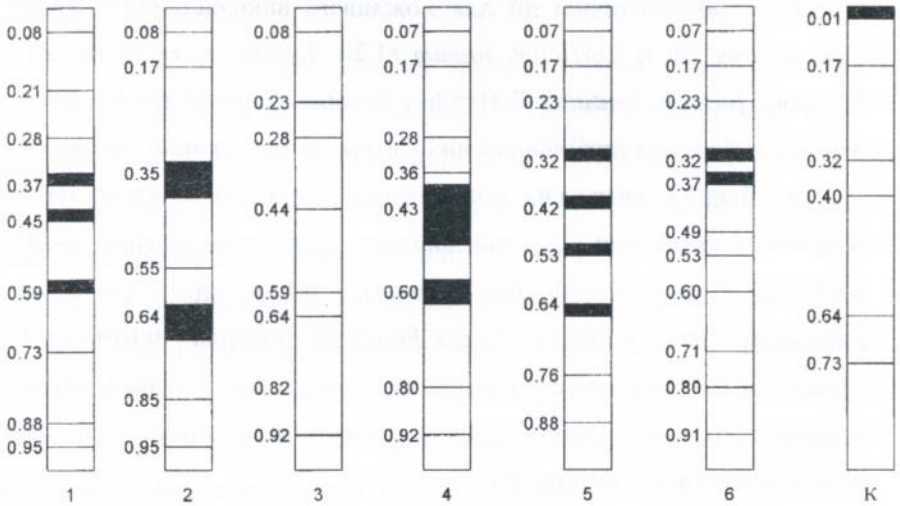


Рис. 5. Схема електрофореграм тромболітичних препаратів, отриманих з вищих базидіоміцетів при 80% насиченості сульфатом амонію:

1 *Corticium roseum* M-20,

2 *Hapalopilus nidulans* ТЧ-02,

3 *Irpex foliaceo-dentatus* Т-31,

4 *Ceriporia subpudorina* СВ-09,

5 *Phellinus igniarius* В-050,

6 *Tyromyces revolutus* ВТ-92,

К - фібринолізин

ВИСНОВКИ

1. Проведено порівняльне вивчення синтезу протеолітичних ферментів різного спектру дії у 191 штаму 80 видів вищих базидіомицетів з порядків *Tricholomatales*, *Agaricales*, *Aphyllphorales*, *Aporpiales*. Встановлено, що в межах окремих систематичних груп грибів (рід, вид) спостерігається великий діапазон коливань фібринолітичної, гемолітичної, казеїнолітичної та тромболітичної активності.

2. З'ясовано адитивний вплив факторів сумісності на фібринолітичну активність монокаріонів тетраполярних видів.

3. Під час скринінгу відібрано ряд активних продуцентів екзопротеїназ тромболітичної дії для можливого використання в медицині, в тому числі *Corticium roseum* М-20, *Tyromyces revolutus* ВТ-92, *Irpex foliaceo-dentatus* Т-31 та ін., здатних лізувати тромби крові людини і зберігати стабільність цієї ознаки при численних пасажах.

4. Вперше визначена максимальна швидкість синтезу тромболітичних ферментів μ_{\max} , що дорівнює - для *Panus tigrinus* К-201 0.047 год.^{-1} , для *Hapalopilus nidulans* - 0.011 год.^{-1} , для *Irpex foliaceo-dentatus* - 0.074 год.^{-1} , для *Fomitopsis pinicola* - 0.010 год.^{-1} . Максимальна тромболітична активність має місце в період експоненціального росту культур, для більшості яких притаманно два піки біосинтетичної активності.

5. Для активних продуцентів: *Ceriporia subpudorina*, *Hapalopilus nidulans*, *Phellinus igniarius* та ін. оптимальні фізико-хімічні умови культивування для синтезу ферментів тромболітичної дії становлять: температура 28-32 °С і початкові значення рН в межах 3.5-4.5 залежно від виду гриба.

6. Встановлено, що досліджувані культури здатні використовувати різні сполуки вуглецевого живлення: глюкозу, ксилозу, фрук-

тозу, лактозу, мальтозу та ін. для синтезу тромболітичних ферментів і накопичення маси міцелію. Менш придатними були інозит і маніт. З усіх випробуваних джерел азотного живлення найбільш придатний був пептон в концентрації 5-10 г/л.

7. Вперше з афілофоральних грибів *Amyloporia lenis* KB-92, *Corticium roseum* M-20, *Tyromyces revolutus* BT-92, *Hapalopilus nidulans* ТЧ-02, *Ceriporia subpudorina* СВ-09, *Irpex foliaceo-dentatus* Т-31, *Phellinus igniarius* В-050 отримані комплексні ферментні препарати тромболітичної дії, які виявили значний рівень тромболітичної активності, що при деяких концентраціях перевищує активність фібринолізину - єдиного промислового тромболітика, що виробляється в Україні.

8. Комплексне дослідження фізико-хімічних властивостей препаратів показало їх термолабільність (втрата властивостей при нагріванні до 50-70 °С); наявність декількох оптимумів рН у кислому і нейтральному середовищах. Для всіх препаратів встановлено наявність спільних білкових фракцій.

9. Як перспективні для подальшого вивчення фізико-хімічних особливостей і отримання гомогенного тромболітичного ферменту рекомендовані культури вищих базидіальних грибів *Amyloporia lenis*, *Corticium roseum*, *Tyromyces revolutus*, *Hapalopilus nidulans*, *Ceriporia subpudorina*, *Irpex foliaceo-dentatus*, *Phellinus igniarius*. Отримання ферменту у кристалічному стані відкриває перспективи для розробки біотехнології виробництва нових промислових тромболітиків.

Головні публікації за темою дисертації:

1. Негруцкий С.Ф., Бойко М.И., Агужен Я.Г., Агаркова И.В. Тромболитическая активность культуральных фильтратов некото-

рых базидиомицетов // Философские и естественно-научные аспекты антропологии.- Санкт-Петербург-Донецк, 1992.- С. 113-116.

2. Сухомлин М.Н., Негруцкий С.Ф., Агужен Я.Г. Некоторые физиологические особенности гриба *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. // Успехи физиологии и биохимии растений: Межвуз. сб.- Днепропетровск: Изд. ДГУ.- 1996.- Вып. 1. - С. 25-31.

3. Сухомлин М.М., Агужен Я.Г. Деякі фізіологічні особливості моно- та дикаріонів гриба *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quel. // Український ботанічний журнал.- 1996.- № 6.- С. 727-733.

4. Агужен Я.Г. Тромболитическая активность базидиомицетов из порядка *Aphyllphorales* // Устойчивость растений к стрессовым явлениям / Донец.ун-т.- Донецк, 1995.- С.160-164.- Деп. в ГНТБ Украины 03.01.96, № 21-Ук96.

5. Агужен Я.Г., Стадничук В.М. О тромболитической активности гриба *Panus tigrinus* // Устойчивость растений к стрессовым явлениям / Донец.ун-т.- Донецк, 1995.- С. 154-159.- Деп. в ГНТБ Украины 03.01.96, № 21- Ук96.

6. Агужен Я.Г. Получение ферментов тромболитического действия из дереворазрушающих грибов // 6 Конференція молодих вчених "Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики" (Київ, жовтень 1996): Тез. доп. - Київ, 1996. - С. 121-123.

7. Негруцкий С.Ф., Бойко М.И., Агужен Я.Г. Фибринолитическая активность культуральных фильтратов базидиальных грибов // Вузовская научная конференция профессорско-преподавательского состава по итогам научно-исследовательской работы: естественные дисциплины (Донецк, ДонГУ, апрель 1993): Тез. докл.- Донецк, 1993.- С.73.

8. Агужен Я.Г. Гемолитическая активность грибов-базидиомицетов // Вузовская научная конференция профессорско-

преподавательского состава по итогам научно-исследовательской работы: естественные дисциплины (Донецк, апрель 1993): Тез. докл.- Донецк, ДонГУ, 1993.- С.77.

9 Агужен Я.Г. Культура *Harpalopilus nidulans* ТЧ-02 - продуцент тромболических ферментов // Вузовская конференция профессорско-преподавательского состава по итогам научно-исследовательской и методической работы: химия, биология (Донецк, апрель 1995): Тез. докл.- Донецк, 1995.- С. 93.

Агужен Я.Г. Высшие базидиомицеты - продуценты тромболических ферментов. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.24 - микология. Рукопись. Институт ботаники им. Н.Г.Холодного, Национальная академия наук Украины, Киев, 1997.

Изучена фибринолитическая, гемолитическая, казеинополитическая и тромболическая активность у 191 штамма 80 видов базидиомицетов из порядков *Tricholomatales*, *Agaricales*, *Aphyllphorales*, *Aporpiales*. В пределах отдельных систематических единиц (род, вид) наблюдаются широкие колебания уровня изучаемых активностей. Установлено, что факторы совместимости аддитивно влияют на фибринолитическую активность монокарионов тетраполярных видов. В ходе скрининга отобран ряд культур, перспективных для получения тромболических ферментов среди которых *Corticium roseum*, *Tyromyces revolutus*, *Irpex foliaceo-dentatus* и др. Для них определена зависимость между синтезом тромболических ферментов, накоплением биомассы и условиями культивирования. Из культуральной жидкости семи наиболее активных штаммов афиллофоральных грибов получены препараты тромболического действия. Определены их некоторые физико-химические

свойства. Для тромболитических ферментов, полученных из грибов *Amyloporia lenis* и *Tyromyces revolutus* показано отсутствие токсичности, что открывает широкие перспективы их применения в медицине.

Ahuzhen Y.G. Hagher Basidiomycete - producers of trombolytic enzymes. Ph. D. Thesis. Speciality 03.00.24 - mycology. M.G.Kholodny Institute of Botany. National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1997.

The research of the fibrinolytic, haemolytic, caseinolytic and trombolytic activity of the 191 strains of the 80 genera of the orders: Tricholomatales, Agaricales, Aphyllophorales, Aporpiales are fulfilled. The wide fluctuation of the investigated activity level within the separate systematic units (genus, species) are observed. It is established that the factors of compatibility influences additively on the fibrinolytic activity of the monocarions of the tetrapolar species. In screening a number of cultures, perspective for receiving the trombolytic enzymes is selected. Among them there are *Corticium roseum*, *Tyromyces revolutus*, *Irpex foliaceo-dentatus* and others. The dependence between the synthesis of the trombolytic enzymes, the accumulation of bioweight and condition of the cultivation is determined for them. The trombolytic preparations from the culture liquid of the most active seven strains are received. Some of their physic-chemical properties are determined. The tocsic absence for the trombolytic enzymes received from fungi - *Amyloporia lenis* and *Tyromyces revolutus* is shown. It opens wide perspectives for applying them in medicine.

Ключові слова: випці базидіальні гриби, ксилотрофи, ферментні системи, протеолітичні ферменти, тромболітичні ферменти.

АГУЖЕН Яна Гешпадіївна
ВИЩІ БАЗИДІОМЦЕТИ - ПРОДУЦЕНТИ
ТРОМБОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

Підписано до друку 21.02.1997р. Формат 60x84/16. Умовн. друк. арк. 1.
Замовлення №104. Тираж 100 прим.

Донецький державний університет
Лабораторія комп'ютерних технологій
340055, м.Донецьк, вул.Університетська, 24

277821

AE 37.016

AB 37.016