МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное

учреждение высшего образования

«Донецкий государственный университет»

Биологический факультет

Кафедра физиологии растений

Направление подготовки 06.03.01 Биология.

(Профиль: Биология)

**К защите допустить:**

И.о. зав. кафедрой физиологии растений

\_\_\_\_\_\_\_\_\_ к.б.н., доцент. Демченко С.И.

«\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2023 г.

**Комплексная тема**

**«Физиолого-биохимические исследования базидиальных грибов – перспективных объектов биотехнологии»**

**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**

**на тему:** **«Влияние режимов культивирования на молокосвертывающую активность штаммов *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.»**

Студент: Хилинская Алиса Евгеньевна \_

Научные руководители: к.б.н., доц. Штирц Ю.А. \_

старший препод. Загнитко Ю.П. \_

Работа представлена на кафедру « » 2023 г. рег. №\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Донецк 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

[ВВЕДЕНИЕ 3](#_Toc134124848)

[1 ОБЗОР ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ 6](#_Toc134124849)

[1.1 История изучения ферментов 6](#_Toc134124850)

[1.2 Классификация ферментов 7](#_Toc134124851)

[1.3 Сферы использования протеолитических ферментов и значение процессов протеолиза 9](#_Toc134124852)

[1.4 Изучение протеолитических ферментов базидиальних грибов 12](#_Toc134124853)

[1.4.1 Влияние способа культивирования и фазы роста на протеолитическую активность базидиальных грибов 20](#_Toc134124854)

[1.4.2 Влияние pH среды на протеолитическую активность базидиомицетов 22](#_Toc134124855)

[1.4.3 Ферменты фибринолитического и тромболитического действия 23](#_Toc134124856)

[1.4.4 Ферменты молокосвертывающего действия 25](#_Toc134124857)

[1.4.5 Електрофоретическое изучение белков базидиальных грибов 27](#_Toc134124858)

[2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА 41](#_Toc134124859)

[2.1 Объект исследований 41](#_Toc134124860)

[2.2 Методы исследований 42](#_Toc134124861)

[2.2.2 Метод определения молокосвертывающей (сычужной) активности 43](#_Toc134124862)

[2.2.3 Метод определения накопления биомассы 43](#_Toc134124863)

[2.2.45 Метод определения рН культурального фильтрата 43](#_Toc134124864)

[2.2.5 Методы статистической обработки результатов 43](#_Toc134124865)

[3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 44](#_Toc134124866)

[3.1 Зависимость молокосвертывающей активности штамма В-02 *Irpex lacteus*Fr. от качества источника углеродного питания 44](#_Toc134124867)

[3.1.1. Исследование МСА в зависимости от источника углеродного питания 44](#_Toc134124868)

[3.1.2 Исследование НБ в зависимости от источника углеродного питания 48](#_Toc134124869)

[3.1.3 Исследование рН культурального фильтрата в зависимости от источника углеродного питания 48](#_Toc134124870)

[3.2 Зависимость молокосвертывающей активности штаммов *I. lacteus* от температуры и продолжительности прогревания мицелия 49](#_Toc134124871)

[3.2.1 Влияние температуры и продолжительности прогревания мицелия на молокосвертывающую активность штаммов *I. lacteus* 49](#_Toc134124872)

[3.2.2Зависимость накопления биомассы штаммами *I. lacteus* от времени культивирования 51](#_Toc134124873)

[ВЫВОДЫ 53](#_Toc134124874)

[СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ 54](#_Toc134124875)

# ВВЕДЕНИЕ

Изучение протеолитических ферментов в последнее время значительно интенсифицировалось. Вот уже несколько десятков лет они находятся на переднем плане развития энзимологии. Протеолитические ферменты были в числе первых белков и первых ферментов, полученных в высокоочищенном кристаллическом виде. На протяжении долгого времени они служили и продолжают служить моделью для изучения кинетики и специфичности ферментативных реакций, а также взаимосвязи между структурами и функциями белков.

Протеолитические ферменты – это группа биологических катализаторов, которые интенсивно исследуются в связи с их значением в теоретическом аспекте – для понимания структуры белков и механизма ферментативного катализа, а также на практике – для медицины, сельского хозяйства и еще для некоторых отраслей промышленности.

Интенсивное применение протеолитических ферментов в медицине, легкой и пищевой промышленности, а также в научных исследованиях выдвигают важную задачу поиска удобных и экономичных источников для получения ферментов в промышленных масштабах.

Много направлений использования ферментов объединяет новая отрасль науки – биотехнология. В последние годы на основе глубокого изучения действия ферментов появилась возможность моделирования технологических процессов. Инженерная энзимология является важным разделом биотехнологии, которая в недалеком будущем обещает внести весомый вклад в обеспечении потребности цивилизации энергией, сырьем, необходимыми веществами и материалами.

Протеолитические ферменты играют исключительно важную роль в обмене веществ, всех живых организмов, начиная от бактерий и низших грибов и заканчивая высшими животными и человеком. Кроме своей основной, наиболее очевидной функцией – расщепление белков пищи до аминокислот, которые их составляют, протеолитические ферменты являются частью цепочки более специфичных, но не менее важных функций. Так, протеолиз лежит в основе таких жизненно важных процессов, как свертывание крови и лизис тромбов. Образование цепочки белковых гормонов и др. физиологически активных пептидов, осуществляется с активным участием протеолитических ферментов.

Возрастающая потребность сыродельной промышленности в сычужном ферменте побуждает исследователей вести поиск продуцентов молокосвертывающих ферментов среди высших растений, различных групп микроорганизмов и грибов. За последние 10 лет внимание исследователей в разных странах стали привлекать базидиальные грибы как перспективные продуценты молокосвертывающего фермента. Базидиомицеты как объекты биотехнологии перспективны в качестве продуцентов белка, ферментов, полисахаридов и других биологически активных веществ. Высшие базидиальные грибы рассматриваются не только как пищевой продукт, но и как ценное сырье, используемое при создании лечебно-профилактических и медицинских препаратов широкого спектра действия. Изучение высших базидиомицетов свидетельствуют, что по своей молокосвертывающей активности их препараты не уступают препаратам животного и микробного происхождения.

Исследователями также было обнаружено, что ферменты, выделяемые в среду высшими базидиальными грибами, способны разрушать фибрин – основной белок тромба. Поэтому изучение особенностей синтеза грибами тромболитических ферментов имеет огромное теоретическое и практическое значение.

**Целью** нашей работы является изучение молокосвертывающей активности штаммов гриба *Irpex. lacteus*Fr.

Для достижения поставленной цели предусматривалось выполнение следующих **задач**:

1. Исследовать зависимость молокосвертывающей активности штамма В-02 *Irpex lacteus* Fr. от качества источника углеродного питания.
2. Установить оптимальный источник углеродного питания для накопления биомассы штаммом В-02 *Irpex lacteus* Fr.
3. Исследовать зависимость изменения кислотности питательной среды в процессе культивирования штамма В-02 *Irpex lacteus* Fr. от различных источников углеродного питания.
4. Исследовать зависимость молокосвертывающей активности штаммов *I. lacteus* от температуры и продолжительности прогревания мицелия
5. Установить оптимальный температурный режим кратковременного прогревания мицелия штаммов *I. lacteus* для максимального накопления биомассы.

*Объект исследования* – штаммы сапротрофного дереворазрушающего гриба *Irpex lacteus* Fr.

*Предмет исследования* – молокосвертывающая активность штаммов *I.lacteus.*

*Методы исследования* – для достижения поставленной цели использованы физиолого-биохимические методы – изучение молокосвертывающей активности, динамики накопления биомассы, кислотностипитательной среды; математико-статистические – для обработкии оценки достоверности полученных результатов.

Научная новизна работы. Впервые проведена оптимизация температурного режима культивирования для максимального выхода протеиназ молокосвертывающего действия штаммами *I. lacteus*.

Практическая значимость работы. Полученные новые экспериментальные данные можно использовать для дальнейшего получения из культуральной жидкости исследуемых штаммов *I. lacteus* ферментного препарата молокосвертывающего действия.

Работа выполнялась на кафедре физиологии растений Донецкого государственного университета.

# 1 ОБЗОР ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

## 1.1 История изучения ферментов

Ферменты являются обязательными участниками химических превращений в живых организмах. Они, как катализаторы, определяют не только возможность протекания химических реакций, но и являются регуляторами этих реакций [77].

История изучения ферментов начинается с открытия, которое было сделано членом Российской Академии наук К. С. Кирхгофом в 1814 году, о возможности превращения крахмала в сахар веществом, которое содержалось в проращенном зерне. Это было одним из первых научных описаний действия ферментов. Открытие Кирхгофом диастазы, или амилазы, можно рассматривать как начало ферментологии.

Позже, в 30-40-е года 19-го столетия, в работах европейских ученых Е. Лейкса, А. Пайена, Ж. Персо, И. Пуркинье и др. Была описана каталитическая активность в зернах многих растений, слюне, желудочном соке. Огромный вклад внесли работы шведского химика Я. Берцелиуса. Он первым нашел связь между химическими и биологическими процессами и объяснил действие катализаторов, которые были выделены из живых организмов, как одну из разновидностей химических реакций. А явление Я. Берцелиуса о принципиальном единстве катализаторов не зависимо от их происхождения создали материалистический фундамент для дальнейших исследований.

50-60-е годы 19-го столетия отмечены новыми успехами в области энзимологии. Были описаны такие ферменты, как трипсин, пепсин, химозин, показательное широкое распространение инвертазы у растений и грибов.

Большой вклад в изучение ферментов внесли русские ученые. Благодаря экспериментам, проведенным А. Я. Данилевським, был установлен факт обратного действия ферментов. Им были предложены новые методы выделения ферментов. И. П. Павлов, изучая процессы пищеварения у животных, пришел к выводу, что ферменты являются телами белковой природы.

Наиболее важным достижением в исследованиях специфичности ферментов в конце 19-го – начале 20-го столетий стали работы известного немецкого биохимика Е. Фишера. Он изучал избирательное действие ферментов, не имея еще сведений об их химической природе. Невзирая на это ему удалось создать в целом верную модель взаимодействия фермента с субстратом на основе комплиментарности их структуры.

К 20-м годам 20-го ст. относится начало работ в области ферментологии известного химика и биохимика Р. Вильштеттера. Он и его ученики заложили основы современной аналитической биохимии. В его лаборатории были разработаны методы экстракции и фракционирования ферментов, открыты коферменты. Однако ему не удалось установить химическую природу ферментов. Еще в 40 годы после работ Вильштеттера разные ученые пытались установить химическое строение ферментов, но она так и не была определена.

Новые достижения аналитической биохимии 50-60-х гг. 20-го ст. связаны с введением таких методов исследования, как электрофорез, хроматография, изотопные методы, привели к полному или частичному очищению сотен ферментов из разных источников. Это стало толчком к интенсивному развитию исследований структуры ферментов с помощью рентгеноструктурного анализа, изучения их кинетики, специфичности, механизмов регуляции и других качеств.

## 1.2 Классификация ферментов

С 1956-го года международной комиссией были начаты работы по классификации ферментов, т. о. число открытых ферментов на то время достигало тысячи, и удовлетвориться их тривиальными названиями по отношению к субстрату было невозможно.

По принятой Международным биохимическим конгрессом классификации все ферменты в соответствии по типу реакции, которую они катализируют, разделены на 6 классов:

- оксидоредуктазы, окислительно-восстановительные ферменты;

- трансферазы, то есть ферменты, которые катализируют перенесение разных групп с одной молекулы на другую;

- гидролазы - ферменты, которые катализируют гидролитические реакции;

- лиазы - ферменты, которые отнимают от субстрата ту или другую группу с образованием двойной связи или, наоборот, присоединяют группу к двойным связям;

- изомеразы катализируют изомеризацию органических соединений;

- лигазы, или синтетазы, катализируют синтетические реакции, которые сопровождаются отщеплениям остатков фосфорной кислоты от АТФ или аналогичного трифосфата.

В каждом классе выделяют подклассы, подподклассы и присвоены индивидуальные порядковые номера ферментов.

Протеолитические ферменты по современной классификации относятся к классу гидролаз, в составе которого образуется особый подкласс пептид-гидролазы. Пептид-гидролазы катализирует реакцию расщепления пептидной связи в белках и пептидах общего вида:

– RCH – CO – NH – CHR' – + H2O → – RCH – CO – OH + H2N – CHR' –

Много ферментов этой группы, наряду с реакциями гидролиза пептидных и эфирных связей, катализируют реакции перенесения аминокислотных остатков на другие акцепторы, так называемые реакции транспептизации и транссестиризации [35].

В основу классификации протеолитических ферментов, которые существуют сейчас, положен принцип субстратной специфичности. В соответствии с этим принципом весь подкласс пептид-гидролаз (3.4.) разделен на 4 группы:

3.4.1. α-аминоацилпептид-гидролазы (аминопептидазы);

3.4.2. пептидил-аминокислотные гидролазы (карбоксипептидази);

3.4.3. дипептид-гидролазы (дипептидазы);

3.4.4. пептидил-пептидгидролазы (протеиназы).

Первую и вторую группы составляют ферменты, которые гидролизируют N- и соответственно C-концевые связи в белках и пептидах. Третью группу составляют ферменты, которые гидролизируют дипептиды. И, наконец, группа пептидил-пептидгидролаз, или протеиназ, состоит из ферментов, которые расщепляют преимущественно внутренние пептидные связи в белках.

## 1.3 Сферы использования протеолитических ферментов и значение процессов протеолиза

Биологически активные вещества грибного происхождения - это разнообразной химической природы соединения первичного и вторичного метаболизма. В низких концентрациях они выполняют с высокой степенью активности и специфичности каталитические, биотические, абиотические и другие функции в жизнедеятельности организмов. Среди них есть такие, что более или менее связанные с клеточными структурами, а другие - в значительном количестве выделяются в питательную среду и получаются при культивировании грибов. Много из физиологически активных метаболитов грибов используются в разнообразных областях промышленности, медицине, сельском хозяйстве. Они играют исключительно важную роль в процессах жизнедеятельности организмов, осуществляя обмен веществ, процессы их ассимиляции и диссимиляции.

Тяжело переоценить роль процессов протеолиза, которые лежат в основе регуляции жизненно важных функций какого-либо организма в широком эволюционном диапазоне – от прокариот к высшим эукариотам. Протеолиз составляет основу многих цепочек метаболизма и в первую очередь процесс сов, связанных с внутриклеточным обменом белков, зимогенной активацией, механизмом процесинга и многими другими. Можно было бы привести бесконечное число примеров, которые демонстрируют решающую роль протеиназ в процессах споруляции, прорастання, клеточной дефиринциации, иммунного ответа, фибринолиза и др. [24].

Длительное время функции протеолитических ферментов связывали исключительно с их ролью в деструктивных, катаболических процессах. Действительно эта функция имеет главнейшее значение. Однако роль протеолитических ферментов не ограничивается процессами деструкции. Все больший интерес привлекают к себе регуляторные функции этих ферментов. Во многих случаях протеазы выполняют роль “пусковых механизмов”, тригеров ряда каскадных процессов наибольше известный пример процессов этого рода – это система свертывания крови. При этом ферменты выполняют функции не только сигнала к запуску такого процесса, но и усилителей этого сигнала, а также берут участие в сопряженных одних физиологических процессов с другими.

Протеолитические ферменты являются во многих отношениях пробными камнями химической энзимологии. В первую очередь на этом классе ферментов проверяются многочисленные прицомы исследований и теоретические концепции. Вместе с тем, закономерности, найденные для этих объектов, имеют общее значение и справедливы для многих других типов биокатализаторов. Это оправдывает детальное рассмотрение в последнее время данных про структуру, свойства и механизм действия именно этой группы ферментов [3].

Успехи в энзимологии находят все больше применение в медицине, особенно во многих аспектах здоровья и заболеваний, диагностики и лечения. Успешно развивается новое направление энзимологии - медицинская энзимология, которая имеет три основные направления, хотя возможность использования энзимологии в медицине теоретически неограниченно.

Первое направление – это энзимопатология, которая имеет целью исследования ферментативной активности в норме и патологии.

Другое направление медицинской энзимологии получило название энзимодиагностики, которая развивается путем применения высокоочищенных ферментов в качестве избирательных реагентов для открытия и количественного определения с диагностической целью нормальных или аномальных химических веществ в биологических жидкостях, так и путем выявления ферментов в сыворотке крови при пораженных органах и тканей.

Третье направление медицинской энзимологии - энзимотерапия, т. е. использование ферментов и регуляторов действия ферментов в качестве лечебных средств, но пока это направление имеет маленькую историю. До сих пор работы в этом направлении выходят за экспериментальные границы. В клинике нашли применение пепсина, трипсина, химотрипсина и других смесей для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта. Кроме протеиназ, ряд других ферментов отдельно или в смеси с протеиназами используются для обработки ран, ожогов, посредников воспаления, для исчезновения гематом и др. Были попытки использования ферментов для лечения злокачественных опухолей человека.

В последнее время увеличилось количество сердечно-сосудистых заболеваний в сравнении с другими заболеваниями, даже такими как, злокачественные новообразования и туберкульоз. Одной из главных причин высокого уровня заболеваний является тромбоэмболия, смертность от которой в пять раз больше, чем от рака. Тромбоэмболитический синдром – местное образование тромба или занесение его в другие части сосудов с полным или частичным закрытием, которое приводит к нарушению кровообращения, развитию ишемии и некрозов – инфарктов органов. В 1906 году было выделено чистый гепарин – тканевой антикоагулянт. Но бесчисленные усилия медиков по предупреждению и лечению тромбозов не имеют желательных результатов.

Протеолитичские ферменты используются при раневых и ожоговых поражениях, которые сопровождаются некрозом ткани, при этом наблюдается разжижение струпов, фибринозно-некротичные та гнойно-фибринозные нальоты и ексудатов. Работа по созданию высоко эффективных ранозаживляющих веществ проводится в направлении поиска ферментов с широкой субстратной специфичностью и образованию и создание пролонгованых форм на основе имобилизованых ферментов [73].

Протеазы грибного происхождения используют в отраслях промышленности, где на определенных стадиях технологического процесса необходимо удаление белков.

Они используются в хлебопекарстве, при изготовлении специальных сортов мучных изделий, в пищевой промышленности при изготовлении белковых гидролизаторов, для смягчения мясных изделий, переработке отходов мясной и рыбной промышленности. В медицине протеазы используются в качестве лечебных средств и при изготовлении диетических продуктов употребления.

Протеазы находят применение в научных исследованиях при необходимости гидролиза белков клетки и их структур, белочной оболочки вирусов и т. д.

Ферменты нашли широкое применение и в других отраслях промышленности, например в пивоварстве, виноделии, меховом и кожном производстве, сыроварении, кулинарии, а также в производстве спиртов, органических кислот, чае, аминокислот, витаминов, антибиотиков и др.

В последнее время их начали использовать и в тонкой химической индустрии для осуществления таких реакций органической химии, как окисление, восстановление, дезаминирование, декарбоксилирование, дегидратация, конденсация.

## 1.4 Изучение протеолитических ферментов базидиальних грибов

Протеолитические ферменты грибов исследуются в двух основных аспектах: при изучении молекулярных основ физиологии и процессов развития в связи с интенсификацией метаболических процессов для увеличения выхода продуктов обмена в биотехнологии [24].

Изучение протеолитической активности высших базидиомицетов представляет несомненный интерес, поскольку позволяет получить более полную картину их биохимической деятельности и их деление по таксономическим группам. Кроме того, острый дефицит протеолитических ферментов во всём мире стимулирует развернутые исследования с целью поиска новых продуцентов протеиназ среди растительных организмов.

Два обстоятельства оправдывают поиск ферментов пищевого и медицинского значения среди высших базидиомицетов: наличие среди них большого количества съедобных грибов и отсутствие спороношение в культуре (последнее уменьшает риск профессиональных заболеваний в условиях производства). Это является значительным преимуществом высших грибов перед традиционным источником протеиназ – микроорганизмами.

Первые сведения о протеолитических ферментах базидиальных грибов относятся к 1966 году. В этом году Н.Л. Маттисон, Н.Н. Фалина и П.А. Якимов опубликовали результаты исследований 16 культур агариковых и афиллофоровых базидиомицетов. Наибольшая протеолитическая активность была отмечена у культуры *Trichoma fulvum*, которая имела систему протеиназ и пептидаз, причем активность первых была значительно выше [32].

В 1973 году Н.Л. Маттисон и Н.Н. Фалина исследовали протеолитическую активность культуральных фильтратов и водных экстрактов из мицелия у 6 видов дереворазрушающих афиллофоровых грибов. Были отобраны наиболее активные продуценты внеклеточной протеазы [21]. В том же году О.П. Низковськая и Н.Л. Маттисон изучали протеолитическую активность агариковых грибов. Было отмечено, что среди грибов, которые отличались наличием относительно активных протеаз, встречались как дереворазрушающие, так и микоризные грибы [38].

Изучение протеолитических ферментов высших базидиальных грибов в последнее время значительно интенсифицировалось. Однако биологическая роль протеиназ в процессах их метаболизма только начинает исследоваться. Проблема биосинтеза протеиназ базидиальными макромицетами является мало исследованной областью микологии. Есть отдельные ведомости про биологическую роль протеиназ в процессах плодообразования *Lentinus edodes, Flammulina velutipes,*спорообразония у *L. edodes* и участие протеиназ в ограниченном протеолизе внутриклеточных ферментов *Schzophyllum commune.* В 80-те годы появились первые ведомости относительно структуры протеиназ базидиомицетов в связи с изучением возможности их практического использования, особенно в качестве молокосвертываемых ферментов [24].

Экспериментальные результаты по изучению протеолитических ферментов у базидиомицетов (исследовано приблизительно 400 видов) и культур (свыше 700 штаммов) высших базидиальних грибов были опубликованы Н. П. Денисовой в 1990 году. Для оценки протеолитической активности в качестве субстратов использовали фибриновые пленки, тромбы крови, а при изучении базидиом – дополнительно казеин и молоко, т.е. оценивали фибринолитическую, тромболитическую, казеиназную та молокосвертывающую активность. Анализ деления протеолитической активности в разных систематических группах агариковых макромицетов показал, что выраженным биосинтезом протеиназ разной субстратной специфичности характеризуются преимущественно семейства *Pleurotaceae* (роди *Pleurotus, Panus*), *Tricholomataceae* (роды *Lepista, Lyophyllum, Flammulina, Armillaria,* некоторые виды рода *Tricholoma*), *Coprinaceae* (род *Coprinus,*некоторые виды рода *Psathyrella*), *Bolbitiaceae.* Для ряда семейств – *Amanitaceae, Cortinariaceae, Strophariaceae, Russulaceae –* характерные низкие значения или отсутствие активности исследуемых ферментов. В группе афилофоровых грибов наибольшее количество культур с активным биосинтезом протеиназ содержалась в семействе *Polyporaceae*, таким образом, активным биосинтезом исследуемых протеиназ характеризовались конкретные таксономические группы базидиомицетов. Было показано, что базидиомицеты синтезируют все четыре известные типы протеиназ – аспартильные (или карбоксильные, кислые), сериновые, тиоловые и металопротеиназы [2]. На основе проведенных экспериментов был созданный банк данных по протеолитической активности высших грибов базидиомицетов, для ряда продуцентов разработаны оптимальные питательные среды [24]. Таким образом, результаты свидетельствовали о выраженной способности к синтезу протеаз у видов семейств *Pleurotaceae, Tricholomataceae, Coprinaceae, Bolbitaceae.* Высокую протеолитическую активность имели все виды семейств *Polyporaceae.* Наиболее часто проявлялась протеолитическая активность у дереворазрушающих сапротрофных грибов, тогда как у симбионтов она встречалась реже. [21; 24].

Использование грибов семейства *Polyporaceae* в качестве источника ряда биологически активных соединений и, прежде всего ферментов делает особенно актуальной проблему разработки критериев и таксономической оценки. В последнее время количество биохимических тестов для характеристики и деферинцирования грибов значительно увеличилось. Так, Тейлор (Taylor, 1974, 1977) предложил для этого 26 биохимических тестов, которые были основаны на определении ферментов по их субстратной специфичности. А в 1982 году Т.Н. Дроздовой и Н.В. Беловой были проведены исследования по изучению ферментативного спектра некоторых грибов семейства *Polyporaceae*. Для характеристики и возможной диферинциации культур, которые определялись в ходе эксперимента, было применено 12 биохимических методов, предложенных Тейлором. Некоторые тесты были им модифицированные в ходе роботы (определение уреазы, эстеразы, кислой и щелочной фосфатазы) [26].

При изучении в 1982 году Т.Н. Дроздовой и Н.В. Беловой ферментативного спектра некоторых грибов семейства *Polyporaceae* ими были сделаны выводы, что по количеству положительных реакций (реакции считались положительными, если зоны лизиса вокруг инукулюма были больше 1 мм после двух суток инкубации) у представителей бурой гнили ферментный набор беднее (25.0 - 37.5%), чем у грибов, которые вызывают белую гниль (62.5 - 94.0%) [26].

В 1984 году Н.П. Денисова опубликовала анализ собственных и литературных данных про биологическую роль протеолитических ферментов высших базаидиальных грибов ряда *Aphyllophorales* (12 видов) и *Agaricales* (4 вида). Отмечено, что изученные грибы имеют подобные физико-химические характеристики внеклеточных протеаз. Протеазы афилофоровых и агариковых культур имеют близкие молекулярные массы – в пределах 35-40 тыс. Основним критерием отнесение фермента к определенному классу служило строение его каталитического центра, о чем не прямо свидетельствовала степень инактивации фермента разнообразными ингибиторными агентами и ионами металлов. На основании этих признаков, а так же оптимума pH действия определенные ферменты могут, отнесены к разным классам протеиназ, причем большинство изученных препаратов являются комплексами разных протеиназ. Протеолитические препараты из культур базидиомицетов содержали в основном кислые карбоксильные протеазы, о чем свидетельствует значение pH оптимума их действия, pH стабильности и изоэлектрические точки. Исключения составляли препараты с *Fomitopsis cytisina, Shizophyllum commune, Flammulina velutipes,* которые содержали нейтральные протеазы и *Coprinus macrorizum,* который содержал щелочную протеазу. Было сделано предположение, что синтез активных карбоксильных протеаз у базидиальных грибов – возбудителей белой (коррозионной) и бурой (деструктивной) гнили – закреплен признак. Более идеальный ферментный препарат грибов белой гнили свидетельствовал о более эволюционном признаке этой группы. Протеазы дереворазрушающих грибов имеют, вероятно, общий генеалогический корень с ферментами животного и микробного происхождения. Наличие в культуре базидиомицетов карбоксильных, сериновых, тиоловых и металлозависимых протеаз отображает универсальность их жизненной системы, которая позволяет быстро усваивать природные субстраты [22]. Итак, ферментные системы не только позволяют удовлетворять потребности грибов в питательных веществах, но и быстро усваивать природный субстрат.

В соответствии с литературными данными, особое внимание уделяется исследованию ферментов, которые принадлежат двум основным классам: оксидоредуктазы и гидролазы.

Первые вспоминания о полифенолоксидазе (П) относятся к 1972 году. Показано, что фенольные вещества, которые добавляли в сусло-агар, ингибировали в разной степени рост 14 видов грибов. Те грибы, у которых присутствовала П., были менее чувствительными к веществам, которые добавляли, в сравнении с грибами, которые не имели П [17]. В 1982 году Т.Н. Дроздовой, Н.В. Беловою были опубликованы результаты изучения состава экзоферментов у 22 видов трутовых грибов, которые вызывают как бурую (1), так и белую (2) гниль древесины. Установлено, что у 1 в отличии от 2 отсутствует П широкого спектра действия [26]. В 1981-1983 годах было проведена попытка выяснения использования микрозообразующими грибами экстрацелюлярных ферментов для проникновения сквозь клетки растения-хозяина и между ними. Во всех исследованиях грибов выявлено большое количество фенолоксидаз. Растворимые фенолоксидазы составляли около 30% общей активности [89]. В 1990 году чешскими учеными (Klan Jaroslaw, Baudisova Dana) были опубликованы результаты качественной оценки активности еще шести оксидоредуктаз: тирозиназы, лакказы, каталазы, пероксидазы, глюкозо-2-оксидазы и диаминоксидазы, которые образуются мицелиальними культурами сапротрофних макромицетов (*Basidiomycotina* и *Ascomycotina*). У 53% из 123 видов найдена тирозиназа, у 67% из 96 видов - лакказа, у 42% из 96 видов - диаминоксидаза, а каталазу и глюкозооксидазу - у всех базидиомицетов [86. Отмечено, что активность лакказы достигла максимума значительно раньше, чем пероксидазы [15]. Результаты исследований, проведенных Х.Г. Гандбаровым над >50 штаммами трутовых грибов, позволяют утверждать, что интенсивный синтез окислительных ферментов наблюдались в стационарной фазе. Для рода *Coriolus* отмечено так же два максимума активности как лакказы, так и пероксидазы. Выявлено, что исследованные грибы значительно более высокую активность ферментов проявляют в условиях твердофазной ферментации, чем при выращивании в жидких средах. Уровень активности значительной степенью изменяется в зависимости от времени года. Однако сезонность не влияет на другие особенности ферментов [16].

Другим, не менее большим классом ферментов, которые выявлены у макромицетов, является класс гидролаз. Первые упоминания про ферментыэтого класса, которые были выделены с *Panus tigrinus*, относят к 1971 году. Согласно литературным данным, в составе плодовых тел было выявлены гидролазы, которые способны расщеплять ряд гуанидинов (α-аргинин, агматин и др.) до мочевины и соответствующих аминокомпонентов [87]. Согласно с уже упоминавшимся источником литературы, наличие уреазы, вместе с эстеразой и кислой фосфатазой (так же относятся к гидролазе), является признаком, которая характерна для возбудителей белой гнили [26]. В результатах исследований, которые были проведены Kawai Masanobu над 82 штаммами *Basidiomycetes*, вспоминаются так же β-1,3-глюканаза и треголаза. Эти ферменты продуцировали как штаммами *Aphyllophorales*, так и *Agaricales*, хотя их активность была недостаточно высокою. В роботах Kawai Masanobu речь идет и про незначительную амилолитическую активность, которую было выявлено у большинства штаммов *Aphyllophorales*, и про более высокую, которая имела место у нескольких штаммов порядка *Agaricales* [84]. Многие авторы указывают и на ксиланазную активность, которая имела место среди штаммов базидиальных грибов [15; 16; 84]. Согласно с литературными данными, большое внимание исследователями отводилось пектиназной (пектолитичной) активности в культурах штаммов как *Ascomycetes*, так и *Basidiomycetes*. Так, среди 82 штаммов *Basidiomycetes* пектолитическая активность была незначительной у большинства *Aphyllophrales*, а среди *Agaricales* было выявлено несколько штаммов, активных в этом отношении [84]. Согласно с другими исследованиями, у 33 штаммов, которые принадлежат до 10 родов *Basidiomycetes*, много было хороших продуцентов пектиназ. О наличии пектиназной активности у макромицетов свидетельствуют так же и другие авторы [16; 81; 89]. Еще большее внимание авторы уделяют целюлолитической и целюлозной активности в культурах штаммов, как аскомицетов, так и базидиомицетов [15; 16; 81; 84].

Однако, наверное, наибольшее внимание исследователями уделялось протеазной (протеолитической) активности как среди штаммов *Ascomycetes,* так и среди штаммов *Basidiomycetes*.

Протеазы гидролизируют белки и полипептиды. Белки играют важную роль в жизни всех живых организмов - человека, животных, растений, микроорганизмов. Они являются наиболее многочисленной и распространенной группой природных соединений.

При химическом и ферментативном гидролизе белков образуются аминокислоты, состав которых в разных белках неодинаковый. Отдельные аминокислоты в молекуле связаны пептидными связями. Протеазы гидролизируют расщепление пептидной связи.

Различают две основные группы протеолитических ферментов: протеиназы и пептидазы. Протеиназы гидролизируют распад белков, главным образом по внутренним пептидным связям, с образованием пептидов с более низкой молекулярной массой. Пептидазы расщепляют конечные фрагменты молекулы с карбоксильного или аминного конца с образованием аминокислот. Представители разнообразных таксономических групп грибов способны усваивать белки в качестве источника углерода и гидролизировать их.

Грибные протеазы делят по их отношению к рН - нейтральные (рН=6,0-7,5), щелочные (рН=8,0-11,0), кислые (рН=2,5-3,0).

Активность образования протеаз грибов, как и других ферментов, зависит от состава среды. Обычно при культивировании грибов на средах, которые содержат белки, протеолитические ферменты образуются значительно активней, чем на средах, которые не содержат белка.

При гидролизе белков разных видов грибов образуется комплекс протеолитических ферментов, но в ряде случаев разные штаммы одного вида могут неодинаково усваивать разные белки.

Наличие высокой активности кислых протеаз отмечено для некоторых штаммов *Aphyllophorales,* а високоактивные нейтральные или щелочные протеазы выявлены у ряда штаммов *Agaricales* [84,40,41]. Протеолитическая активность была явной у многих из 33 штаммов, которые принадлежали к 10 родам *Basidiomycetes* [81]. Наличие протеолитической активности было выявлено и у мицелиальных экстрактов и фильтратов культуральной жидкости микоризообразующих грибов [89]. В целом же было отмечено, что интенсивный синтез гидролаз, как правило, наблюдался в фазе активного (экспоненциального) роста у >50 грибов. Найдено, что исследуемые грибы значительно более высокую активность ферментов выявляют в условиях твердофазной ферментации, чем при выращивании в редких питательных средах [16].

### 1.4.1 Влияние способа культивирования и фазы роста на протеолитическую активность базидиальных грибов

В 1973-1979 годах Л.Н. Федорова и др. опубликовали результаты изучения протеолитической активности у грибов порядка *Agaricales* и *Aphyllophorales* в поверхностной и глубинной культуре. Результаты свидетельствуют о том, что протеолитическая активность в глубинной культуре обычно была меньшей, чем при поверхностном выращивании, протеолитическая активность культурального фильтрата так же была меньшей, чем протеолитическая активность экстракта из мицелия. Максимумы протеолитической активности культурального фильтрата и экстрактов с мицелием совпадали или с максимумом накопления биомассы, или с началом автолиза мицелия. Возбудители бурой гнили древесины имели более низкий уровень протеолитической активности. У возбудителей гнили древесины протеолитическая активность была сравнительно высокой. Протеолитическя активность афилофоровых грибов в целом была небольшой, в связи, с чем авторы считают возможность их использования в качестве продуцентов протеолитических ферментов незначительным [39; 40; 64; 66]. В 1984 году угорский ученый Vetter Janos опубликовал результаты изучения экзо и эндоцелюлярных протеаз мицелиальных культур 16 видов рода *Pleurotus*, которые свидетельствуют о том, что в случае достаточного питания возможна функция ферментов понижается. Отличия в активности протеаз, которые были виявлены между видами автором, были связаны с эколого-адаптационными отличиями [93]. Ведомости про протеазную активность базидиальних грибов имели место и в зарубежной литературе [83; 92].

При изучении фибринолитического действия ферментных комплексов in vitro, а позже и in vivo было установлено, что механизм лизиса фибринового субстрата протеиназами базидиомицетов состоит из прямого действия на фибрин и активаторной, то есть через преобразование плазминогена (который содержится в фибрине и в цельной крови) на плазмин, который в свою очередь гидролизирует фибрин [2].

В 1996 году Н. В. Псурцева и А. Я. Мнухина опубликовали результаты роботы, посвященной изучению активности экзопротеиназ у штаммов рода *Flammulina* в глубинной и поверхностной культуре. Для большинства штаммов этого рода лучшим является поверхностное выращивание, а в глубинном культивировании они достаточно требовательные. Штаммы, которые изучались на протяжении многих лет как продуценты протеиназ фибрино- и тромболитического действия, имели высокую ферментативную активность, особенно тромболитическую, исключительно при поверхностном культивировании. Все исследуемые штаммы были способны синтезировать внутриклеточные протеиназы фибринолитического и тромболитического действия в глубинной культуре. Максимальная ферментативная активность отмечается в конце стадии накопления биомассы – начала стационарной стадии, тогда же, когда наблюдалась и максимум накопления биомассы [52; 53]. Внесение глюкозы при культивировании *Hirschioporus laricinus* на среде с этиловым спиртом в любой фазе роста продуцента влечет за собой увеличение МСА и биомассы. В этом направлении работала и Никитина, которая пришла к выводу, что добавление натрий хлор приводит к более раннему проявлению максимальных значений МСА. По результатам дальнейших работ было установлено, что большая часть секреции протеаз молокосвертывающего действия приходиться на экспоненциальную фазу роста. Синтез внеклеточного молокосвертывающего фермента репрессируется источниками углерода, а следовательно необходимо использовать повышенные в 2 раза дозы по сравнению со стандартными глюкозо-пептонными средами концентрации сахаров. Этим достигается больший выход фермента и повышает его активность.[36, 42, 43, 44, 45, 46].

### 1.4.2 Влияние pH среды на протеолитическую активность базидиомицетов

Условия кислотно-щелочного равновесия в среде культивирования является одной из важнейших причин, которая влияет на рост и метаболическую активность грибов.

Большинство высших базидиальных грибов имели оптимум для роста в слабо кислом диапазоне pH. Обычно регуляция pH среды в процессе жизнедеятельности грибов осуществляется за счет поглощения определенных катионов и анионов, а также вследствие выделения некоторых метаболитов. Многие высшие базидиомицеты продуцируют в значительном количестве такие органические кислоты, как щавелевая и некоторые дикарбоновые кислоты цикла Кребса, которые могут привести к подкисленнию среды [28].

Кислотность среды оказывает существенное влияние на продуцирование грибами разнообразных ферментных систем. Априории можно считать, что уровень pH окружающей среды, который задается грибами, должен в определенных границах отвечать области оптимальных значений pH внутренних ферментов, что обеспечивают жизненно важные потребности организмов в питании.

Диапазон активности амидгидролаз охватывает интервал приблизительно в десять единиц pH. В середине каждой группы ферментов область активности локализована в более узких границах. Однако встречаться ферменты, что функционируют в области, далеко от оптимума pH для большинства представителей этой группы.

Большинство с амидгидролазами нестойкие к граничным показаниям pH, при которых они обратимо или необратимо конформационно изменяются. Протеолитические ферменты, кроме этого, могут подлежат автолизу. Например, большинство аспартатных протеаз стойкие только в кислой или слабо кислой среде необратимо инактивируются при pH > 6. Сериновые протеазы обратимо инактивируются в сильно кислой среде. Так, уже при pH 6 – 8 раствор химотрипсина содержит приблизительно 10% неактивной формы. Субстраты и субстрат подобные ингибиторы смещают равновесие в бок активной формы. Скорость перехода из активной конформации в неактивную относительно невелика и поэтому может влиять на кинетические параметры гидролиза субстрата [3].

Безусловным практическим и теоретическим интересом является изучение влияния исходных значений кислотно-щелочного равновесия на продуцирование ферментов дерево разрушительными грибами. Определение оптимальных условий для биосинтеза ферментов позволит увеличить их выход с единицы объема, регулировать состав ферментных систем. Однако на данный момент этот вопрос остается мало изученным для высших базидиальных грибов.

### 1.4.3 Ферменты фибринолитического и тромболитического действия

Одной из важнейших проблем, которые стоять перед медициной, является поиск эффективных средств лечения и предупреждение сердечно-сосудистых, тромбоэмболических заболеваний, которые связаны с нарушениями свертываемости крови и фибринолиза. Сейчас известны тромболитические препараты не полностью удовлетворяющие потребностям практической охраны здоровья. В связи с этим, наряду с работами по усовершенствованию уже известных препаратов, ведется широкий поиск новых ферментных средств, при этом важнейшим этапом исследований является отбор высокоэффективных продуцентов.

Попытки использования протеолитических ферментных систем велись в двух направлениях: в медицине и в пищевой промышленности. В первом случае исследовали способность протеолитических ферментов грибного происхождения вызывать лизис фибриновых дисков и искусственно полученных тромбов - речь шла про фибринолитическую и тромболитическую активность высших грибов.

Первые ведомости про фибринолитическую и тромболитическую активности комплекса протеолитических ферментов, который было выделено из гриба *Flammulina velutipes,* относиться к 1975 году. Этого года В.П. Гаврилова и Н.Н. Фалина опубликовали результаты исследования фибринолитической и тромболитической активностей указанного комплекса. Было установлено, что полученный фермент состоит из трех компонентов, которые отличаются по концентрации белка и близки по молекулярному весу [11,79].

В 1981 году Н.П. Денисова и Н.Н. Фалина опубликовали результаты исследований, проведенных над ферментным препаратом, который был получен из культурального фильтрата *F. velutipes.* Было указано, что препарат имел высокую фибринолитическую и тромболитическую активность. Максимальная тромболитическая активность приводила к лизису тромбов за 2 часа, фибринолтическая активность в среднем колебалась в границах 15000 ед./мг белка. По фибринолитической и тромболитической активностям препарат не уступал террилитину (фибринолитику микробного происхождения). Было рассмотрена возможность использования опенка зимнего в качестве продуцента фибринолитических препаратов [20].

В 1986 году И.А. Альохина опубликовала результаты поиска активных ферментов фибринолитического действия в культурах базидиомицетов. На наличие внеклеточных протеаз фибринолитического действия было исследовано 300 культур из коллекции высших базидиомицетов. Указано, что наиболее часто высокая фибринолитическая активность наблюдалась в группе микоризообразователей. В группе афилофоровых грибов было выделены семейства *Polyporaceae* и *Schizophyllaceae,* в группе агариковых - семейства *Tricholomataceae* и *Boletaceae* [1].

Способностью к синтезу молокосвертывающего действия обладает и съедобный гриб *Sparassiscrispa*, а так же вещества с окислительными и антиокислительными способностями. Это имеет теоретическое и практическое значение, поскольку данный гриб занесен в красную книгу Украины и требует искусственного культивирования. [63]

Результаты исследований, проведенных Н.П. Денисовой, И.Р. Семеновой и В.И. Сухаревич так же свидетельствуют о том, что высшие базидиомицеты являются перспективными продуцентами ферментов медицинского назначения. Они, изучив динамику биосинтеза ферментов фибринолитического и тромболитического действия при глубинном способе культивирования культурами высших базидиомицетов: *Irpexlacteus,Fomes fomentarius, Fomitopsis pinicola, Funalia trongii,* роды *Clitocybe, Boletus, Coprinus.* Наибольшей ФА характеризовались 5 культур агариковых базидиомицетов из родов *Clitocybe, Boletus, Coprinus.* Дальнейшая работа с культурами *Clitocybe* не имела смысла, поскольку ФА была нестабильной, а уровень ее резко снизился в результате частого культивирования. Культура из рода *Boletus* так же малоперспективна, т. к. рядом с высокой ФА имела низкую ТА и значительные сроки культивирования. Культура *Coprinus* оказалась наиболее перспективной для дальнейших работ с целью биотехнологического использования. Среди афилофоровых грибов высокую ФА имели штаммы *Fomes fomentarius* и *Fomitopsis pinicola.* Были так же выявлены культуры, которые практически не выявили ферментативной активности в глубинных условиях (*Irpex lacteus, Fomes fomentarius, Funalia trongii).* Кроме этого, использования на животных показали, что мицелий отобранных штаммов не токсичный [23].

В 1992 году Н.П. Денисовой и др. были опубликованы результаты исследований фибринолитических и тромболитических качеств базидиального гриба *Coprinus domestricus.* Было отмечено, что штамм является еще более перспективным продуцентом перечисленных выше ферментов, чем отобранный раньше гриб *Flammulina velutipes* [19].

### 1.4.4 Ферменты молокосвертывающего действия

В наше время во многих странах мира (Япония, Англия, США, Канада и др.) интенсивно ведутся работы по изучению и использованию молокосвертывающих ферментов растительного и бактериального происхождения. В поисках заменителей животного сычуга исследования проводились как среди высших растений, так и среди плесеней, бактерий и высших грибов. Пока что таких исследований малою В Японии были изучены 44 штамма базидиомицетов на способность к синтезу молокосвертываемых ферментов. Установлено, что 2 вида гриба – *Irpex lacteus* Fr. и *Fomitopsis pinicola* (Fr.) Karst. – образуют протеазы, которые являются хорошими заменителями сычуга.

В 1974 году Федоровой и Шыриной были исследованы 79 штаммов (51 вид) базидиомицетов с целью найти продуцентов ферментов молокосвертывющего действия. Среди дереворазрушающих грибов наибольшая молокосвертывающая активность выявлена у *Flammulina velutipes.* Средняя активность – *Panellus stypticus, Panus tigrinus* и *Funalia trongii.* Другие виды имели очень слабую активность. Кроме того, 14 штаммов (11 видов) не выявили молокосвертывающей активности (*Armillaria mellea, Gymnopilus hybridus, G. junonius, Inonotus obliquus, Kuehneromyces mutabilis, Lyophyllum ulmarium, Pholiota squarrosa, Pleurotus dryinus, P. ostreatus, Oudemansiella radicata).* Из 79 исследованных штаммов 46 синтезировали протеазы, которые выявляли молокосвертывающую активность. Особенно перспективными для дальнейшего изучения являются виды *Antrodia mollis* и все штаммы *F. velutipes* [65].

Первые ведомости о молокосвертывающих качествах среди *Basidiomycetes* относятся к 1973 году. Этого года Kawai Masanobu опубликовал результаты изучения способности сворачивать молоко у 82 штаммов базидиомицетов. Было показано, что большое количество штаммов *Aphyllophorales* имели высокую протеолитическую активность в кислой среде, а *Agaricales* - в нейтральной, что указывало на образование этими штаммами кислой нейтральной и щелочной протеаз соответственно [83]. Наличие высокоактивных продуцентов ферментов свертывания молока среди *Basidiomycetes* отмечено так же и другими авторами [67; 88; Федотов О.В. (1995), Бойко М.И. (1996), Агужен Я.Г. (1997), Никитина О.О. (1999) и др.].

### 1.4.5 Електрофоретическое изучение белков базидиальных грибов

На современном этапе развития микологических исследований усилилась тенденция по использованию при решении вопросов таксономии и филогении, рядом с классическими методами, биохимических методов, которые сейчас стали неотъемлемой частью арсенала систематики.

За последние два десятилетия в систематике макромицетов широко использовались методы электрофоретического фракционирования белков (ЭФ). Цифровые данные, их анализ и оценка возможностей этих методов для исследования с таксономией грибов приводятся так же в ряде публикаций. Но наиболее удалые хемотаксономические исследования грибов были проведены на микромицетах.

Исследования белков, образование пигментов в культуре, активность целюлазы и лаказы у представителей порядков высших *Basidiomycetes* показало, что, например, в границах каждого порядка существуют специфичные по электрофоретичной подвижности белки. В границах рода количество белковых полос, общих для отдельных видов, было немного большим, чем в границах надродового таксона. Полученные данные, которые свидетельствуют о значительной видоспецифичности белковых фракций у высших *Basidiomycetes*

Метод электрофореза является перспективным и для определения внутривидовой изменчивости грибов. Так, А. Брезински [80], исследовавши методами моно- и двумерного электрофореза белки карпофоров высших грибов из родов *Agaricus, Macrolepiota, Pleurotus,* получил для каждого таксона специфические электрофоретические профили.

Однако при использовании этого метода возникает ряд проблем, без решения которых использование ЭФ-данных для таксономии и филогении грибов в значительной степени обесцениваются. Так, следует определить возрастную, сезонную, экологическую, географическую, морфогенетическую изменчивость белков, особенности ЭФ-спектров белков разных частей карпофора, влияние замораживания или выслушивания материала на фракционный состав белков, что изучаются.

Не обращая на различия в оценке результатов ЭФ-анализа белков грибов разными исследователями большинство из них считают этот метод перспективным для углубленных систематических исследований, монографирования таксонов [10].

Первые литературные данные про попытки выделить протеолитические ферменты из грибов относятся к 1972 году. Было показано, что восьмикратное кон центрирование культуральной среды повышает активность в два раза. Осаждение белков культуральной жидкости при разных концентрациях сульфата аммония показало, что максимальная активность ферментов, которую было выявлено в фракции, превосходит исходную в 80 разов. При осаждении белков ацетоном, спиртом и хлороформом установлено, что наилучшую концентрацию дает ацетон, тогда как хлороформ полностью угнетает активность ферментов.

Через год после этого американскими учеными было опубликованы результаты электрофореза ферментов девяти видов *Polyporus.* Было установлено подобность электрофорограмм у изолятов одного вида, чем при сравнении изолятов разных видов. Было так же указано, что на характер электрофореграммы могут влиять условия выращивания культуры. Обговаривались перспективы использования электрофорограмм в качестве таксономического критерия [90].

В 1976 году Белозерская и др. провели сравнительное изучение качеств белков растворимой фракции из мицелия разного возраста представителя базидиомицетов *Lentinus tigrinus,* а так же плодовых тел на разных стадиях их развития. Сравнивались электрофоретическая подвижность белков мицелия, выращенного при разных условиях освещения, а так же плодовых тел, которые были выращены на свету и в темноте. В мицелии *L. tigrinus* разного возраста наблюдался подобный общий характер разделения в электрофорезе растворимых белков. В 10-15-суточном мицелии были определены 17 белковых компонентов. При культивировании мицелия гриба на твердой среде оказываются те же белковые фракции, что и в мицелии на редкой среде. Обращает внимание относительное увеличение в мицелии гриба, который культивировался на твердой питательной среде, части компонентов с низкой подвижностью и снижение части быстро подвижных компонентов. В процессе индивидуального развития гриба в мицелии после 10 и 15 суток роста, а так же при переходе от мицелия к плодовому телу выявляются незначительные отличия в электрофоретической подвижности белков растворимой фракции. Некоторые отличия так же наблюдались в электрофоретических способностях белковых компонентов в отдельных частях диференцированых плодовых тел гриба – ножке и шляпке. При культивировании мицелия *L. tigrinus* на разных типах питательных средах были виявлены значительные отличия в электрофоретических способностях белков растворимой фракции гриба [7].

В 1981 году В.П. Гавриловой были опубликованы результаты изучения состава белков в мицелии и культуральном фильтрате дереворазрушительного гриба *Flammulina velutipes*. Речь шла про белки, которые растворяются в воде, 10% NaCl, 70% этаноле, 0.2% NaOH и трис-глициновом буфере. Было установлено, что в состав мицелия входят α- и β-глобулини, спирто- и щелочно-растворимые фракции. Как внутриклеточные, так и позаклеточные белки, что синтезируются грибом, складываются в основном из легкорастворимых фракций [14].

В ходе исследований, проведенных японскими учеными Kobayaschi Fumio, Yabuki Minoru, Hoshino Kasuro та Sakamoto Masayochi с помощью ионно-обменной хроматографии и гель-фильтрации было выделено кислую протеазу, которая хорошо сворачивает молоко. С помощью препарата кислой протеазы из фильтрата культуры гриба было приготовлен сыр [85].

В 1975 году Т.К. Дроздова опубликовала результаты электрофоретического изучения белков. С целью определения степени подобности и отличия в содержании белков между отдельными видами грибов рода *Coriolus* использовали метод дискового электрофореза в полиакриламидном геле. Исследования 30 штаммов шести видов грибов, которые вызывают белую и бурую гнили древесины. Установлено, что для всех видов грибов, которые изучались, характерно наличие значительного количества общих фракций. В разных штаммах одного вида отличия были незначительными. Авторы считают, что электрофоретический анализ белков дает возможность получить некоторые новые таксономические характеристики [25]. Авторским коллективом была проведена работа по выделению ферментов протеолитического действия из культурального фильтрата с помощью волокнистых ионитов: карбоксильном катионите и полиамфолите. Считают, что, варьируя тип носителя, а так же содержание в ном ферментного комплекса, можно изменить его активность и таким образом изменить скорость растворения тромбов. Полученный уровень гидролитической активности имобилизированного на волокнах фламмулина свидетельствует о возможности использования волокон, которые содержат ферменты гриба, для гидролиза белковых субстратов [13]. Японскими учеными была проведена работа по очищению и изучению свойств экзо-β-1,3-глюканазы из базидиомицетов. Методами фракционирования сульфатом аммония, колончатой хроматографии на SP-сефадекси и карбоксиметилцелюлозе, гель-фильтрации на сефадекси удалось получить очищенную в 430 раз экзо-β-1,3-глюканазу, выход которой составил 10%. Описано некоторые свойства фермента, ингибитора [91]. Данные про подобные исследования можно встретить и у других авторов [94].

В статье К.А. Шагинян, И.А. Альохиной, Н.П. Денисовой речь идет про сериновую протеазу из высшего базидиомицета *Coprinus.* Методами ионообменной хроматографии достигнуто 32-кратного очищения и полученный фермент с выходом 55%. Описанный состав фермента, его свойства [75].

Литературные данные показывают на разнообразные свойства выделенных протеаз. Так, молекулярная масса может варьировать в границах 30000 - 70000, изоэлектрическая точка - в границах 2,5 - 8,5. Большое внимание уделяли ингибированию вообще и ингибиторам отдельно. Отмечено, что ингибиторами могут служить как неорганические вещества (катионы металлов), так и органические вещества (простые и складные) [75; 91; 94].

Изучение белков в молокосвертывающих ферментных препаратах проводилось и на грибах рода *Tyromycetes*karst. Это позволило благодаря морфологическим особенностям интродуцированных штаммов впервые получить грибные молокосвертывающие ферментные препараты в кристаллическом виде.[60].

Пищевая и биологическая ценность продуктов микробного происхождения определяется, прежде всего, содержанием белка и его составом. Про биологическую эффективность можно предварительно судить по аминокислотному составу (но это не всегда отражает действительную картину). В зависимости от растворимости белки можно разделить на четыре фракции: альбумины, проламины, глобулины и глютелины. Наиболее сбалансированными с физиолого-биохимической точки зрения, и наиболее доступными считаются протоплазменные белки - альбумины и глобулины и менее сбалансированными и доступными - резервные - проламины и глютелины. В.С. Олешко, В.Г. Бабицкой был изучен белковый состав в двух экологических группах: почвенные сапротрофы, которые относятся к классу *Deuteromycetes* - *Penicillum verruculosum, Aspergillus carbonarius, Alternaria tenuis* и ксилотрофы из класса *Basidiomycetes,* которые вызывают белую гниль древесины - *Coriolus versicolor, C. hirsutus, Tyromyces lacteus.* Фракционный состав белков микроорганизмов находится в большой зависимости от индивидуальных особенностей продуцента, изменяются в процессе онтогенеза культур, зависит от условий культивирования, предыдущей термообработки полученных биомасс и других факторов.

Все изученные культуры отличались хорошим аминокислотным профилем. Кроме того, количество альбуминов значительно выше у ксилотрофов, чем у сапротрофов, что, возможно, связано с более сложным источником их питания и синтезом более активного комплекса ферментов. Из-за заменимых аминокислот отмечалось высокое содержание глютаминовой кислоты, глицина, аланина и пролина. Пролин практически полностью был сосредоточен в водорастворимых фракциях белков [47].

В 1999 году в ходе проведенной серии исследований Шарковой Т.С. и Максимовым В.Н. было выявлено, что ферментативная активность хищного гриба-нематофага -*Аrthrobotrys longa Mecht.-* в процессе сохранения культуры имела тенденцию к снижению. Это касалось в первую очередь протеиназ активаторного типа, потому что общая фибринолитическая активность сохранялась на достаточно высоком уровне. Подбором оптимального соотношения фосфат-ионов и ионов цинка в среде удалось повысить содержание активаторов плазминогена в комплексном препарате лонголитина. Было установлено так же, что из состава среды следует исключить магний и нет необходимости добавлять в среду молибден [76].

**1.5 Новые исследования в области ферментологии**

В 2001 году Б.П. Батомункуева и Н.С. Егоров разработали способ выделения, очистки и разделения комплекса протеиназ из культуральной жидкости микроскопического гриба *Aspergillus ochraceus* 513. Способ основан на применении аффинной хроматографии на бациллихин – силохроме и колоночной хроматографии с использованием смолы DEAE Toyopearl 650 M кооперативнго механизма действия. Исследователи получили внеклеточный фермент направленного действия типа активаторов протеина С, с молекулярной массой 36.5 кДа. Эффективность полученного фермента близка к таковой у активаторов протеина С из яда щитомордников. Изучили фибринолитические и антикоагулянтные свойства выделенного фермента [4].

В мировой медицине в настоящее время находят применение тромболитические средства микробного происхождения. На основе микробных протеолитических ферментов могут быть получены тромболитики, осуществляющие аналогично плазмину крови человека, прямой гидролиз тромбов или действующие как тканевые активаторы плазминогена крови человека [4].

В последнее время в связи с открытием функциональной роли системы протеина С в гемостазе человека весьма перспективными в лечении, предупреждении и диагностике тромбообразования становятся средства, активирующие эту антикоагулянтную систему, осуществляющую первую линию защиты от гиперсвертывания крови в организме. К настоящему времени известны активаторы протеина С, выделенные из ядов змей некоторых видов щитомордников. Общим для этих активаторов протеина С, как и для комплекса, тромбин – тромбомодулин, образующегося при физиологической активации протеина С, является то, добавление активатора к плазме крови приводит к удлинению времени активированного частичного тромбопластирования (АЧТВ) вследствие инактивации активированным протеином С факторов V и VIII свертывания крови, необходимых для образования тромбина. Также в экспериментах на животных выявлена антикоагулянтная активность препаратов активатора протеина С из яда щитомордника. Однако более доступными и перспективными могут оказаться протеиназы микробного происхождения, активирующие систему протеина С.

Целью данной работы была разработка методов выделения, очистки и разделения комплекса внеклеточных протеиназ микроскопического гриба *Aspergillus ochraceus* 513 специфического действия типа активаторов протеина С [4].

В 2002 году Б.П. Батомункуева и Н.С. Егоров из фильтров культуральных жидкостей штаммов грибов *Aspergillus ochraceus* 513 и  *Aspergillus alliaceus* 7 *dN* 1 путем осаждения сернокислым аммонием и последующей гель – фильтрацией на колонках с сефадексом G – 25 для освобождения от ионов аммония получили препараты внеклеточных протеолитических ферментов, обладающих высокой антикоагулянтной активностью по типу активаторов протеина С. Они изучили рН – оптимум активности и рН – стабильность выделенных препаратов протеолитических ферментов грибов *A.ochraceus* 513 и *A.alliaceus* 7 *dN* 1, а также температурный оптимум активности действия этих ферментов и их устойчивость к температурной денатурации [5].

Исследования рН – стабильности грибных протеиназ показали, что при повышении кислотности среды оба препарата теряли активность. Оптимум действия протеиназ грибов *A. ochraceus* 513 и *A. alliaceus* 7 *dN* 1 наблюдался при температуре 50 ˚С, когда и казеинолитическая, и антикоагулянтная активности имели максимальные значения. Активность препаратов исследуемых культур была стабильна в интервале температур от 6 до 50 ˚С в течение 1ч. При высоких температурах (85 ˚С) протеиназы обоих грибов довольно быстро инактивировались, а при двух или трехчасовом нагревании препараты практически полностью теряли активность.

Целью данной работы было изучение некоторых характеристик внеклеточных протеиназ исследуемых микроскопических грибов [5].

В 2004 году Ж.И. Павловская, Р.В. Михайлова и И.В. Мороз опубликовали статью о влиянии условий культивирования *Penicillium piceum* F – 648 на образование каталазы и глюкозооксидазы [48].

Активными продуцентами каталазы и глюкозооксидазы являются мицелиальные грибы рода *Penicillium* (Никольская, Синявская, 1971; Михайлова и др., 1998). Особый интерес представляют продуценты, синтезирующие одновременно каталазу и глюкозооксидазу, что позволяет получать комплексный ферментный препарат в условиях одной ферментации.

Известно, что образование ферментов микроорганизмами в значительной степени зависит от количества и качества посевного материала, температуры культивирования продуцента, исходного рН питательной среды, а также способа его выращивания. При получении ферментов мицелиальных грибов в качестве посевного материала использовали споровую суспензию, количество и качество которой существенно влияли на длительность ферментации и выход конечного продукта [48].

В данной работе показано влияние срока хранения *P. piceum* F – 648, используемого для получения споровой суспензии, на образование каталазы и глюкозооксидазы.

Существенное влияние на синтез исследуемых ферментов оказывает температура выращивания гриба [48].

Немаловажным фактором, влияющим на рост культуры и образование ферментов, является исходная кислотность питательной среды. Так, исследованиями О.И. Синявской (1978) установлено, что *P. vitale*  синтезирует каталазу на среде с рН 4.0 – 6.0, *P. verruculosum* – 3.0 – 4.0, *P. canescens* – 5.0 – 6.0. Образование глюкозооксидазы мицелиальными грибами также происходит при значительных исходных значениях среды (Traegeret et al., 1991; Caridis et al., 1991; Petruccioli, Federici, 1993).

Сравнительное изучение роста и образования оксидоредуктазы при глубинном и стационарном выращивании *P. piceum* F – 648 выявило значительное влияние способа культивирования на исследуемые процессы. При глубинном выращивании гриб активно рос и к 3 – м суткам ферментации его биомасса составляла 9.6 мг/мл культуральной жидкости. В условиях стационарной культуры к этому времени накапливалось в 2 раза меньше биомассы.

Таким образом, оптимальным условием для одновременного образования каталазы и глюкозооксидазы является глубинное выращивание *P. piceum* F – 648 на среде с исходным рН 5.0 – 6.0 при температуре 25 ˚С [48].

В 2006 году Д.А. Кадималиев, О.С. Надежина, Н.А. Атыкян, В.В. Ревин и В.Д. Самуилов описали исследование состава липидов и продуктов их окисления в мицелии, а также активности внеклеточных ферментов ксилотрофного гриба *Lentinus (Panus) tigrinus* штамм BKMF – 3616D в процессе погруженного культивирования. Установлено, что фазе активного роста и максимальной секреции лигнолитических ферментов соответствует повышенное содержание легкоокисляемых фосфолипидов, ненасыщенных жирных кислот и вместе с тем низкое содержание продуктов перекисного окисления липидов. Выявлена определенная взаимосвязь между составом липидов мицелия и секрецией лигнолитических ферментов [29].

В последние годы базидиомицеты привлекают все большее внимание исследователей как организмы, обладающие уникальными внеклеточными ферментными лигнолитическими и целлюлолитическими комплекса. Благодаря этому они являются единственными организмами способными полностью разрушать основные компоненты древесины – лигнин и целлюлозу, а также большое количество разнообразных ксенобиотиков. В этом отношении внимание заслуживает гриб *Lentinus (Panus) tigrinus,* обладающий высокой лигнолитической активностью. Уровень и механизмы секреции лигнолитических ферментов во внеклеточную среду зависят от изменений в химическом составе цитоплазматической мембраны. Они выполняют не только барьерные функции, но, являясь микроокружением многих белков и ферментов, вовлекаются в трансмембранные процессы, включая транслокацию ферментов через цитоплазматическую мембрану. Каждой фазе роста соответствует определенное соотношение основных ФЛ и физическое состояние клеточной мембраны. Кроме того, есть данные о значительной роли в процессах деградации лигнина продуктов перекисного окисления липидов. Установление взаимосвязи между этими процессами позволит не только лучше понять механизмы участия липидов в функционировании внеклеточного лигнолитического ферментного комплекса (ВЛФК), но и регулировать процессы его синтеза и секреции.

Цель работы – изучение состава липидов, продуктов их перекисного окисления и лигнолитической активности гриба *L. tigrinus* штамм BKMF – 3616D при погруженном культивировании [29].

В 2006 году Я.Е. Дунаевский, Дун Чжан, А.Р. Матвеева, Г.А. Белякова, М.А. Белозерский опубликовали экспериментальную статью об исследовании способности различных ксилотрофов продуцировать внеклеточные протеолитичеслие ферменты; изучении факоров среды, регулирующих их секрецию. С помощью прямого определения протеолитической активности в культуральной среде, а также постэлектрофоретического определения активности протеаз в полиакриламидном геле, сополимеризованном с желатином, обнаружено количественное и качественное разнообразие секретируемых ферментов. Показано, что уровень активности внеклеточных протеолитических ферментов сильно зависит от содержания присутствующего в среде белка, углевода и рН среды. Все секретируемые протеазы заметно различались по молекулярной массе (от 51 и выше 95 кДа) и принадлежали, в основном, к двум классам протеолитических ферментов – сериновым и металлопротеазам [27].

Ксилотрофные макромицеты занимают важное место в структуре растительных биоценозов. Грибы этой группы участвуют в деградации таких сложных биополимеров клеточной стенки растений как целлюза, лигнин, пектиновые вещества, гемицеллюлозы, белковые вещества. В значительной степени эти грибы привлекают внимание как возможные участники процессов биодеградации растительных отходов, а также как продуценты активных гидролитических ферментов.

Биодеградация естественных субстратов ксилотрофных грибов является многоступенчатым, полиферментативным процессом, в котором участвуют как комплексы окислительных ферментов, так и внеклеточные гидролитические ферменты, такие как целлюлазы, ксиланазы, пектиназы, протеазы и др. В результате последовательного окисления групп ферментов, секретируемых грибами во внешнюю среду, происходит расщепление молекул субстратов с образованием легкоусвояемых низкомолекулярных олигомеров и мономеров, которые используются грибами для восполнения энергетических потребностей, а также в многочисленных метаболических процессах [27].

На сегодняшний день протеиназы идентифицированы у ряда базидиомицетов. Калиш с соавт. Показали, что три вида базидиомицетов способны расти на среде с белком в качестве единственного источника N, C и S и секретировать протеолитические ферменты. Однако сами ферменты не были охарактеризованы. Венейблс и Уоткинсон нашли протеиназную активность у 8 базидиомицетов. Главные внеклеточные металлопротеиназы были найдены у *Chohdrostereum purpureum*, а также в вегетативном мицелии *Lentinus edodes*. Однако, в целом, протеолитические ферменты ксилотрофных базидиомицетов остаются слабо охарактеризованными, мало известно также о механизмах, контролирующих их продукцию.

В связи с вышесказанным целью данной работы была идентификация внеклеточных протеаз различных видов ксилотрофов, изучение условий, влияющих на секреции, а также частичная характеристика этих ферментов.

Способность к синтезу определенных ферментов обусловлена генотипом продуцента, но ее реализация в значительной степени зависит от условий культивирования и состава среды. Заметным отличием исследованных базидиомицетов оказалось отсутствие жесткого требования к обязательному присутствию белкового субстрата в культуральной среде для секреции внеклеточных протеаз. Количественные изменения внеклеточных активностей зависели как от времени культивирования, так и от концентрации присутствующего в среде белка [27].

При этом следует отметить, что возрастание общей протеолитической активности, измеряемой по гидролизу белкового субстрата азоказеина, на 2-4 суток опережает увеличение специфических протеолитических активностей, определяемых на специально отобранных синтетических субстратах. Возможно, раннее действие неспецифических протеаз является необходимым для последующего подключения к протеолизу более специализированных ферментов. Наибольшее возрастание всех исследованных активностей достигнуто при использовании в качестве единственного источника азота 1.5-2 % казеина. Таким образом, наличие белка в среде культивирования является не обязательным для секреции внеклеточных протеаз, но требуется для получения их максимального уровня.

Важную роль в определении величины внеклеточной протеолитической активности играют углеводы. Среди тестированных моносахаридов фруктоза оказалось наиболее оптимальным компонентом среды. Это может быть связано с более эффективным транспортом или метаболизмом фруктозы.

Заметное влияние на регуляцию продукции внеклеточных протеаз оказывает рН среды.

Проведенные исследования показали, что продукция внеклеточных протеолитических ферментов у ксилотрофов, в отличие от других ранее изученных мицелиальных грибов, не индуцируется наличием белка в среде, хотя в количественном плане зависит от его содержания, также как от типа использованного углевода и рН среды. Через такую регуляцию, возможно, внешняя среда обеспечивает уровень протеаз, необходимых как для более эффективного разрушения клеточной стенки растений, так и для поддержания определенного потока азотистых соединений от растения к грибу [27].

Н.Г.Бицадзе опубликовал статью о способности к выделению пектолитических, целлюлозолитических ферментов и токсических веществ патогенным грибом *Coniothyrium cerasi* [8].

Среди многочисленных ферментов грибом особенно важными являются целлюлозолитические и пектинолитические. С их помощью гриб разрушает клеточную стенку растения-хозяина, которая состоит из целлюлозы и пектиновых веществ, и тем обеспечивает себе проникновение и питание в растении (Тарр, 1975).

В 2006 году Л.В. Степанова, О.М. Цивилева, В.Е. Никитина и др. исследовали гемагглютинирующую активность некоторых базидиальных ксилотрофов на стадии дикариотического мицелия.

Обобщив результаты влияния на гемагглютинирующую активность таксономической принадлежности грибов, способа культивирования (твердофазное, жидкофазное), состава питательной среды и типа эритроцитов в реакции гемаггаглютинации, можно судить о том, какие из перечисленных факторов оказывают наибольшее влияние на биосинтез внеклеточных лектинов [57].

Таким образом, проявление гемагглютинирующей активности грибных культур – представителей ксилотрофных базидиомицетов на стадии дикариотического мицелия в большей степени зависело от способа культивирования и типа эритроцитов, используемых в реакции гемагглютинации, и в меньшей степени – от таксономической принадлежности культур и химического состава сред, что косвенно подтверждает данные об уникальности агглютининспецифических взаимодействий (Лахтин, 1994; Rudiger, Gabius, 2001) [57].

## 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

### 2.1 Объект исследований

Исследовали штаммы D-1, D-8, D-9 и В-02 *Irpex lacteus* Fr*.* на способность к синтезу ферментов, обладающих молокосвертывающей активностью.

Систематическое положение *Irpex lacteus* Fr.:

Отдел *Basidiomycota* (Базидиомицеты)

Класс *Agaricomycetes* (Агарикомицеты)

Порядок *Polyporales* (Полипоровые)

Семейство [*Irpicaceae*](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=Irpicaceae&action=edit&redlink=1)

Род *Irpex*

Вид *Irpex lacteus* (Ирпекс молочно-белый)

*Irpex lacteus –* ирпекс молочно-белый. [Плодовые тела](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BB%D0%BE%D0%B4%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D0%B5_%D1%82%D0%B5%D0%BB%D0%BE_%D0%B3%D1%80%D0%B8%D0%B1%D0%B0) однолетние, распростёртые или с небольшим шляпочным отгибом, черепитчато сливающиеся, кожистые. Верхняя поверхность отгиба бороздчатая, опушённая, белая или сероватая, затем буреющая. Край плёнчатый, часто более светлый. [Ткань](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D1%8F%D0%BA%D0%BE%D1%82%D1%8C_(%D0%BC%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F)" \o "Мякоть (микология)) белого цвета, тонкая, до 0,5 мм (редко до 2 мм) толщиной. Ирпекс не содержит каких-либо ядовитых веществ, однако его жёсткие тонкие плодовые тела не дают причислять его к [съедобным грибам](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%8A%D0%B5%D0%B4%D0%BE%D0%B1%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%B3%D1%80%D0%B8%D0%B1%D1%8B).



Рисунок 2.1 – *Irpex lacteus* (Ирпекс молочно-белый) [64]

*Irpex lacteus* Fr. – ирпекс молочно-белый. Плодовые тела распростертые, иногда с отвернутыми в виде боковых шляпок краями, волосистые, белые, с концентрическими бороздками. Зубцы располагаются густыми рядами, сначала сдавленные, сетчатые, затем вытянутые, рассеченные, заостренные, белые. Споры бесцветные эллиптические, 4 – 6 / 2 - 3μ.

Гифы мицелия в большей степени тонкостенные, иногда толстостенные 2-4 μ шириной, с перегородками, но без пряжек, цыстиды более или менее многочисленные и разные по форме: веретеноподобные или цилиндрические до булавоподобных, иногда гифоподобные, без инкрустации или инкрустованные обычные только в верхней части мелкими кристалликами, 50-150X4-8 μ; базидии 15-25Х3-4,5-(5) μ, с 2-4 стеригмами до 3-4 μ длиною; споры гиалиновые, элипсоподобные, чаще в основе косо заостренные, 4-6Х2-3 μ.

Произрастает на отмерших стволах и ветках, пнях лиственных, изредка хвойных, деревьев. Разрушитель древесины. Вызывает белую гниль.

В Украине встречается везде, где достаточно влаги, на дубе, тополе, акации, рябине, вишне и т.д.

### 2.2 Методы исследований

#### 2.2.1 Питательные среды

**Твердая питательная среда (глюкозо-картофельный агар)**

1. Глюкоза – 10 г;

2. Картофель –250 г;

3. Агар–агар – 9 г. (агароид – 25 г.);

4. Дистиллированная вода – до 1 литра.

Среду разливать в пробирки по 12 – 14 мл.

**Жидкая глюкозо–пептонная питательная среда:**

1. Глюкоза - 10,0 г;

2. Пептон - 3,0 г;

3. CaCl2 – 0,05г;

4. KH2PO4 – 0,6г;

5. K2HPO4 – 0,4г;

6. MgSO4 \* 7H2O – 0,5г;

7. ZnSO4 \* 7H2O – 0,001г;

8. Дистиллированная вода – до 1 литра.

**Жидкая модифицированная глюкозо– пептонная питательная среда (пат. Украины N 6121: Бойко, Негруцкий, Федотов, Борисенко,1997):**

1. Глюкоза - 18,0 г;

2. Пептон - 8,0 г;

3. CaCl2 – 0,11г;

4. KH2PO4 – 0,6г;

5. K2HPO4 – 0,4г;

6. MgSO4 \* 7H2O – 0,9г;

7. NaCl – 0,18г;

8. ZnSO4 \* 7H2O – 0,001г;

9. Дистиллированная вода – до 1 литра.

### 2.2.2 Метод определения молокосвертывающей (сычужной) активности

Метод основан на определении времени, за которое происходит свертывание молока (Kawai, Mukai, 1970). Субстрат: свежее натуральное молоко с добавлением 10 М-3 CaCl2\*2H2O, рН=6.0.

Расчет МСА вели по следующей формуле:

 (1);

где К – коэффициент разведения КФ; П – время, в течение которого из 100 мл молока при добавлении 1 мл КФ образуется плотный сгусток, в мин; 40 – среднее время свертывания молока при производстве сыра, в мин.

### 2.2.3 Метод определения накопления биомассы

Накопление биомассы определяли весовым методом [Петербургский, 1968] после высушивания образцов в термостате при температуре 105°С на протяжении 10 часов до постоянного веса и выражали в г/л.

### 2.2.4 Метод определения рН культурального фильтрата

рН культурального фильтрата определяли потенциометрическина рН-метре AI-123.

### 2.2.5 Методы статистической обработки результатов

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась по схеме двухфакторного дисперсионного анализа по специально разработанной программе. Сравнение средних осуществляли по методу Дункана [32, 51].

## 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Зависимость молокосвертывающей активности штамма В-02 *Irpex lacteus*Fr. от качества источника углеродного питания

Штамм выращивали на стандартной жидкой модифицированной глюкозо-пептонной питательной среде (контроль) с добавлением вместо глюкозы сахарозы, галактозы, лактозы, ксилозы, манита в пересчете на углерод глюкозы (опыт).

### 3.1.1 Исследование МСА в зависимости от источника углеродного питания

Результаты статистической обработки данных эксперимента показали, что биосинтез ферментов молокосвертывающего действия зависит от источника углеродного питания, сроков культивирования и взаимодействия этих факторов.

Максимальный уровень МСА (рисунок1) наблюдается на контрольной питательной среде в стационарной фазе роста (10-25 сутки культивирования) штамма В-02 *Irpex lacteus* , где в качестве источника углеродного питания использовалась глюкоза. Минимальные показатели МСА были зафиксированы на 5-е сутки проведения эксперимента при добавлении в питательную среду манита. При использовании сахарозы, галактозы, лактозы, ксилозы, как источников углеродного питания, отмечены достоверно более низкие показатели МСА, чем в контроле.

Таким образом, можно сказать, что глюкоза является наиболее оптимальным источником углеродного питания при культивировании штамма В-02 *I. lacteus* с целью получения ферментов молокосвертывающего действия.

Результаты эксперимента также показали, что манит нецелесообразно использовать в качестве источника углеродного питания при культивировании штамма В-02 *I. lacteus*с целью повышения выхода в питательную среду ферментов молокосвертывающего действия.



Рисунок 3.1 – Зависимость МСА штамма В-02 *Irpex lacteus* от источника углеродного питания

0

0,02

0,04

0,06

0,08

0,1

0,12

0,14

0,16

0,18

5

10

15

20

25

30

**Возраст, сутки**

Глюкоза

Сахароза

Галактоза

Лактоза

Ксилоза

Манит

**НБ, ед/мл**

Рисунок 3.2 – Накопление биомассы штаммом В-02 *I. lacteus* на средах с различными источниками углерода



Рисунок 3.3 – Изменение рН питательной среды штаммом В-02 *Irpex lacteus* при использовании различных углеводов

### 3.1.2 Исследование НБ в зависимости от источника углеродного питания

Характер накопления биомассы штамма В-02 *Irpex lacteus* от источника углерода иллюстрируется рисунком 2.Так, данный штамм максимальное количество биомассы образовал на среде, содержащей глюкозу, сахарозу, галактозу и лактозу на 15 и 20 сутки культивирования. Примерно одинаковое количество биомассы (данные достоверно не отличались) образовалось на средах содержащих сахарозу и глюкозу на протяжении всего периода культивирования.

На среде, содержащей в качестве источника углеродного питания ксилозу показатели накопления биомассы до 20 суток культивирования включительно были достоверно более низкими, чем на средах с содержанием глюкозы, сахарозы, галактозы и лактозы, но достоверно более высокими, чем на среде с манитом. На 30 сутки роста (фаза старения) уровень накопления биомассы на среде, содержащей ксилозу был достоверно максимальным по сравнению с другими источниками углеродного питания.

Наименее подходящим углеводом для накопления биомассы был манит, на питательной среде с его содержанием отмечены достоверно минимальные показатели накопления биомассы исследуемым штаммом и только в период старения гриба показатели накопления бимассы достоверно были более высокими, чем на начальных этапах культивирования.

### 3.1.3 Исследование рН культурального фильтрата в зависимости от источника углеродного питания

Изученный штамм В-02 *Irpex lacteus* на питательной среде с манитом сильнее всего изменял кислотность питательной среды в щелочную сторону относительно контроля (глюкоза) (рис. 3.3.4.1) . Не исключено, что это связано с усиленным синтезом белков не молокосвертывающего действия и выделением в среду других веществ щелочной природы. Возможно, этим и объясняется низкая молокосвертывающая активность штамма В-02 *Irpex lacteus* на манитно-пептонной питательной среде.

### 3.2 Зависимость молокосвертывающей активности штаммов *I. lacteus* от температуры и продолжительности прогревания мицелия

Исследования проводили со штаммами D-1‚ D-2‚ D-8 и D-9 *I. lacteus*. Гриб выращивали на модифицированной жидкой глюкозо-пептоной среде при температуре 28˚С (контроль) и в день снятия результатов прогревали в термостате при температуре 40˚С в течение 3-х часов (опыт). Молокосвертывающую активность определяли на 5, 10, 15, 20, 25 и 30 сутки культивирования.рН среды составляла 4,0.

### 3.2.1 Влияние температуры и продолжительности прогревания мицелия на молокосвертывающую активность штаммов *I. lacteus*

МСА штаммов *I. lacteus*в зависимости от температуры (28˚С и 40˚С) и времени культивирования приведена на рисунках 4 и 5. Как показали данные статистической обработки, на 5 сутки культивирования максимальная МСА наблюдалась у штамма D-8 при температуре 28˚С, штамм D-9 не показал достоверных различий между контролем и опытом, а штаммы D-1 и D-2 в контрольном варианте имели достоверно более высокий показатель МСА, чем в опыте. На 10 сутки проведения эксперимента только штамм D-9 показал наибольшую МСА при прогревании, все другие, исследуемые штаммы не имели достоверной разницы показателя МСА между контролем и опытом. На 15 сутки снятия результатов достоверно максимальный показатель МСА имел штамм D-9 в опыте, а штаммD-2 – в контроле,штамм D-8 не имел различий МСА между контролем и опытом. На 20 сутки опыта штамм D-9 показал максимальную МСА при прогревании, остальные штаммы не имели достоверной разницы в показателях МСА контроля и опыта. На 25 сутки культивирования лишь штамм D-9 показал достоверную максимальную разницу МСА при прогревании, остальные штаммы не имели различий в данном показателе контроля и опыта. На 30 сутки эксперимента все исследуемые штаммы не показали достоверных отличий показателя МСА между контролем и опытом.

Рисунок 3.4 – Зависимость МСА от температуры (t=28˚С) и времени культивирования штаммов *I. lacteus*

Рисунок 3.5 – Зависимость МСА от температуры (t=40˚С) и времени культивирования штаммов *I. lacteus*

Итак, можно сказать, что при кратковременном прогревании мицелия при температуре 40оС у штамма D-9 на 15 сутки культивирования показаны максимальные показатели МСА по сравнению с контролем. Возможно, это связано с тем, что в данный период культивирования штамм синтезирует максимальное количество ферментов молокосвертвающего действия, а кратковременное прогревание мицелия при критических температурах вызывает частичное повреждение клеточных стенок и выход фермента в питательную среду.

### 3.2.2 Зависимость накопления биомассы штаммами *I. lacteus* от времени культивирования

Накопление биомассы штаммами *I. lacteus* в зависимости от времени культивирования приведено на рисунке8. На 5 сутки проведения опыта достоверно максимальное накопление биомассы наблюдалось у штамма D-8, а минимальное – у штамма D-1. На 10 сутки культивирования максимальное накопление биомассы показал штамм D-1, а минимальное – у штамма D-8. На 15 и 20 сутки штамм D-2 показал максимальное накопление биомассы, а минимальное – на 15 сутки штамм D-1 и 20 сутки штамм D-8. На 25 сутки минимальное накопление биомассы показал штамм D- 9, а на 30 сутки – штамм D-8. Максимальное накопление биомассы на 25 и 30 сутки культивирования наблюдалось у штамма D-1.

Итак, можно сказать, что уровень накопления биомассы мицелия исследуемыми штаммами плавно повышается до 20 суток культивирования, далее (на 25 сутки роста) достоверно незначительно снижается и на 30 сутки проведения эксперимента снова достоверно повышается. Вероятно, эти изменения связаны с процессами автолиза в фазе старения гриба.

Изменение уровня накопления биомассы исследуемыми штаммами *I. lacteus*на протяжении 30 суток эксперимента соответствовало основным фазам роста грибов: лаг-фаза (5 сутки), экспоненциальная (10-15 сутки), стационарная (20-25 сутки) и фаза отмирания (30 сутки).

Рисунок 3.6 – Накопление биомассы штаммами *I. lacteus*в зависимости от времени культивирования

## ВЫВОДЫ

Таким образом, по результатам проведеннях экспериментов можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что для образования протеиназ молокосвертывающего действия штаммом В-02 *Irpex lacteus* оптимальным источником углеродного питания является глюкоза.
2. Так, изучаемый штамм образовал максимальное количество биомассы на среде, содержащей глюкозу, сахарозу, галактозу и лактозу.
3. На протяжении всего времени эксперимента штамм В-02 *I. lacteus* подщелачивал исходную питательную среду, содержащую в качестве источника углеродного питания манит.
4. Повышение температуры до 40°С вызывает ингибирование синтеза ферментов молокосвертывающего действия у всех исследованных штаммов, кроме штамма D-9 *I. lacteus.*
5. При кратковременном прогревании мицелия при температуре 40оС у штамма D-9 на 15 сутки культивирования показаны максимальные показатели МСА по сравнению с контролем (28оС).
6. Изменение уровня накопления биомассы исследуемыми штаммами *I. lacteus* на протяжении 30 суток эксперимента соответствовало основным фазам роста грибов, что свидетельствует о том, что подобранные условия являются оптимальными для роста исследуемых штаммов.

# СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

1. Алехина И.А. Поиск активных ферментов фибринолитического действия в культурах базидиомицетов // Тр. 1 Молод.конф. ботан., Ленинград, апр. 1986. Ч.1. - Ботан. ин-т АН СССР. - Л., 1986. - С. 191-196.

2. Андреенко Г. В. Фибринолиз. Химия и физиология процесса. М.:Медицина, 1967.

3. Антонов В. К. Химия протеолиза / АН. Ин-т биоорг. Химии им. М. М. Шемякина. – М.:Наука, 1991. – 504 с.

4. Батомункуева Б.П., Егорова Н.С. Выделение, очистка и разделение комплексного препарата внеклеточных протеиназ *Aspergillus ochraceus* 513 с фибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Микробиология, 2001. - № 5. – С. 602-606.

5. Батомункуева Б.П., Егорова Н.С. Изучение препаратов внеклеточных протеиназ грибов *Aspergillus ochraceus* 513 и *Aspergillus alliaceus* 7 Dn 1 // Микология, 2002. - №1. – С. 56-58.

6. Белова Н. В., Псурцева Н. В., Мнухина А. Я., Алехина И. А.Современные направления експериментального исследования базидиомицетов // Микология и фитопатология 1997. - №6. - С. 64-67.

7. Белозерская Т. А., Крихкий М. С. И Коптяева И. Б.Электрофоретический аналіз белков растворимой фракции из гриба *Lentinus tigrinus* (Fr.)Fr. // Микология и фитопатология 1976. - 2. - С. 97-99.

8. Бицадзе Н.Г. Способность к выделению пектолитических, целлюлозолитических ферментов и токсических веществ потогенным грибом *Coniothyrium cerasi* // Микология и фитопатология 2006. - № 5. – С. 433-436.

9. Блажевская Ю. В., Вембер В. В., Жданова Н. Н. Сравнительный анализ скорости радиального роста микромецотов, выделенных из различных экотопов, Ж. Микробиология, Т.64, №3, 2002 – 3-11.

10. Бойко С.М. Зміна активності молокозсідального ферменту гриба *Irpex lacteus* в залежності від температури культивування // Питання біоіндикації і екології. – Запоріжжя, 21-24 вересня 1998. - С. 78.

11. Вассер С.П., Брунь Г.О., Гізбулліна В.К. Хемотаксономічне дослідження грибів порядку *Boletales* Gilb. // Український ботанічний журнал, 1990. – Т. 47. - № 3. – С. 46-53.

12. Гаврилова В.Г., Фалина Н.Н. Фермент протеолитического действия, полученный из гриба *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing. // Микология и фитопатология 1975. - 5. - С. 431-433.

13. Гаврилова В.П., Гончарова П.А., Шамолина И.П., Вольф Л.А. Выделение ферментов протеолитического действия из культурального фильтрата *Flammulina velutipes* (Fr.) Karst. с помощью волокнистых ионитов // Микология и фитопатология 1980 - 4. - С. 328-331.

14. Гаврилова В.П. Внутриклеточные и внеклеточные белки дереворазрушающего гриба *Flammulina velutipes* (Fr.) Karst. // Микология и фитопатология 1981 - 2. - С. 121-123.

15. Гандбаров Х.Г., Мурадов П.З., Атакишиева Я.Ю. Особенности биосинтеза полисахараз и оксидаз у дереворазрушающего базидиомицета *Bjerkandera adusta* (Fr.) Karst. // Микол. и фитопатол. 1986. - 6. - С. 485-489.

16. Гандбаров Х.Г. Ферментативные свойства дереворазрушающих высших базидиальных грибов // Биосинтез ферментов микроорганизмами // Тез.докл. 4 Всес. конф. - Ташкент. - 19-22 сент. - 1988. - С. 48-49.

17. Голикова М.Я. Оксидазная активность некоторых дереворазрушающих грибов // Науч. Тр. Ленинг. лесотехн. акад. - 1972. - 144. - С. 8-12.

18. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов, Санкт-Петербург. Изд-во ГИОРД 2003. – 313 с.

19. Денисова Н.П., Псурцева Н.В., Фалина Н.Н., Петрищев Н.Н., Киянов В.И. Штамм базидиального гриба *Coprinus domestricus* (Fr.) Gray BKMF 2459 D - продуцент фибринолитич. и тромболитич. ферментов // Ботан. ин-т им. В.Л. Комарова. - Л. - Мед.ин-т. - 3642122.

20. Денисова Н.П., Фалина Н.Н. Ферментативная активность препарата из зимнего опенка *Flammulina velutipes* // Микология и фитопатология 1981. - 2. - С. 123-125.

21. Денисова Н.П. Протеолитическая активность культур высших грибов// Микология и фитопатология 1982 - 5. - С. 458-466.

22. Денисова Н.П. Природа и биологическая роль протеиназ базидиальных грибов // Микология и фитопатология 1984 - 2. - С. 116-121.

23. Денисова Н.П., Семенова И.Р., Сухаревич В.И. Биосинтез протеиназ фибринолитического действия высшими базидиомицетами в глубинной культуре // Микология и фитопатология 1989 - 4. - С. 378-381.

24. Денисова Н.П. Протеиназы высших базидиомицетов // Микология и фитопатология 1990 - 6. - С. 478-485.

25. Дроздова Т.Н. Электрофоретическое изучение белков некоторых представителей семейства *Polyporaceae* // Микология и фитопатология 1975 - 2. - С. 135-137.

26. Дроздова Т.Н., Белова Н.В. Ферментный спектр некоторых грибов семейства *Polyporaceae* // Микология и фитопатология 1982 - 1. - С. 33-36.

27. Дунаевский Я.Е., Дун Чжан, Матвеева А.Р., Бел якова Г.А., Белозерский М.А. Деградація белковых субстратов ксилотрофными бвзидиомицетами // Микология, 2006. - № 1. – С. 46-51.

28. Дудченко Л. Г., Семичаевский В. Д. И Мельничук Г. Г. Влияние рН среды на продуцирование внеклеточных ферментов дереворазрушающими базидиомицетами // Микология и фитопатология 1988 - 2. - С. 135-137.

29.Кадималиев Д.А., Надежина О.С., Атыкян Н.А., Ревин В.В., Самуилов В.Д. Взаимосвязь состава липидов и продуктов их перекисного окисления с секрецией лигнолитических ферментов в процессе роста *Lentinus (Panus) tigrinus* // Микробиология, 2006 - № 5. С. 649-653.

30. Клечак И. Р., Бисько Н. А., Билай В. Т., Особенности биодеструкции виноградной выжимки в процессе роста мицелия *Lentinus edodes*, Ж. Микология и фитопатология, Т.33, вып. 1, 1999.

31. Лобанюк А. Г., Бабицкая В. Г., Пленина Л. В., Пучкова Т. А., Осадчая О. В., Состав и билогическая активность глубинного мицелия ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes*, Ж. Прикладная биохимия и микробиология, Т.39, №1, 2003 – 69-73.

32. Маттисон Н.Л., Фалина Н.Н., Якимов П.А. Об активности протеолитических ферментов глубинных культур некоторых базидиальных грибов // Продукты биосинтеза высших грибов и их использование. - Л.: Наука, 1966. - С. 31-38.

33. Маттисон Н.Л., Фалина Н.Н. Протеолитическая активность афиллофоровых грибов в условиях глубинной культуры // Высшие грибы и их физиол. активн. соед. - Л.: Наука, 1973. - С. 10-12.

34. Методические указания к математической обработке результатов экспериментов по физиологии растений (для студентов 3-6 курсов дневной и заочной форм обучения) // Негруцкий С.Ф., Фильчаков Л.П. - Донецк, ДонГУ, 1984. – 12 с.

35. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты. М.:Наука, 1971. – 404 с.

36. Негруцький С. Ф., Фільчаков Л. П., Кривоодубський О. О. Вплив джерел вуглецевого і азотного живлення на ріст базидіоміцета *Hirschioporus abietus* (Fr) Donk, Укр. бот. ж. Т.53, №6, 1996 – 722-726.

37. Неклюдов А. Д., Бердутина А. В., Иванкин А. Н., Карпо Б. С. Кинетические характеристики ферментного гидролиза сложных белковых субъектов для получения питательных сред, Ж. Прикладная биохимия и микробиология, Т.38, №4, 2002 – 381-388.

38. Низковская О.П., Маттисон Н.Л. Протеолитическая активность агариковых грибов в культуре // Высш. грибы и их физиол. активн. соедин. - Л.: Наука, 1973. - С. 13-19.

39. Низковская О.П., Федорова Л.Н., Милова Н.М. Характеристика культур агариковых грибов по протеолитической активности // Микология и фитопатология 1975 - №6. - С. 486-489.

40. Низковская О.П., Федорова Л.Н., Дроздова Т.Н. Протеолитическая активность безидиомицетов из порядка *Aphyllophorales* // Микология и фитопатология 1979 - №3. - С. 217-220.

41. Низковская О. П., Федорова Л. Н., Дроздова Т. Н., Протеолитическая активность базидиомицетов из порядка *Aphyllophorales*. Молокосвертывающая активность, Ж. Микология и фитопаталогия, Т.14, №1, 1980 – 36-39.

42. Никитина О. А. Влияние рН среды на накапление молокосвертывающего фермента штаммами *Hirschioporuslaricinus*, Ж. Микробиолоия, Т.60, №4, 1988 – 43-47.

43. Никитина О. А. Аминокислоты, как источники азотного питания штамма А-031 *Hirschioporus laricinus* – продуцента молокосвертывающего фермента, Материалы професорско-преподавательского состава, 1997 – 79-81.

44. Никитина О. А., Бойко М. И., Негруцкий С. Ф., Влияние различных концентраций натрий хлора на молокосвертывающую активность и накопление биомассы *Hirschioporus laricinus*, ДонНУ, 1998- С. 76-78.

45. Нікітіна О. О., Бойко М. І, Негруцький С. Ф., Вплив складу живильного середовища на біосинтез молокозсідального ферменту *Hirschioporus laricinus*(Karst) Ruv (Polyporaceae), Укр. бот. ж. Т.56, №4, 1999 – С. 426-429.

46. Озерова Л. В., Никитина О. А., Влияние времени внесения глюкозы на молокосвертывающую активность и рост *Hirschioporus laricinus* (Karst) Ruv, ДонНУ, 2003 -С. 58-59.

47. Олешко В.С., Бабицкая В.Т. Аминокислотный и фракционный состав белков грибного происхождения // Микология и фитопатология 1991 - №3. - С. 233-239.

48. Павловская Ж.И., Михайлова Р.В., Мороз И.В. Влияние русловий культивирования *Penicillum piceum* F-648 на образование каталазы и глюкозооксидазы // Микология и фітопатологія 2004- № 1. – С. 77-82.

49. Патент на винахід. Україна. № 22915А с 12 №1/38. Живильне середовище для вирощування штаму М-81 *Hirschioporus laricinus* – продуцента молокозсідального ферменту / Бойко М.І., Негруцький С.Ф., Федотов О.В., Борисенко О.О. Опубл. 05.05.98.

50. Поляков В. А., Римарева Л. В., Оверченко М. Б, Трифонова В. В. Сравеительная характеристика ферментних препаратов протеолитического действия по степени гидролиза мікробного Белка, Ж. Прикладная биохимия и микробиология, Т.36, №3, 2000 – С. 299-302.

51. Приседський Ю.Г. Програми статистичної обробки експериментальних даних. - Донецьк, 2000. – 15 с.

52. Псурцева Н. В., Мнухина А. Я. Культуральная характеристика и активность экзопротеиназ базидиомыцетов рода *Flammulina.* Ι. Поверхностное культивирование // Микология и фитопатология 1996 - №1. - С. 44-47.

53. Псурцева Н. В., Мнухина А. Я. Культуральная характеристика и активность экзопротеиназ базидиомицетов рода *Flammulina.* ΙΙ. Глубинное культивирование // Микология и фитопатология, 1996. - №2. - С. 39-42.

54. Сафонов В.И., Сафонова М.П. Исследования белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 113-136.

55. Соломко Е. Ф., Ламберг М. Л., Митропольська Н. Ю., Чоловська О. В. Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на поживних середовищах різного складу, Укр. бот. ж. Теоретичні та прикладні питання, Т.57 №2,2000 – 119-125.

56. Стадничук В.М. Вплив температури на фізіолого-біохімічні показники культур деяких дереворуйнівних базидіоміцетів // Питання біоіндикації і екології. - Запоріжжя. - 21-24 вересня 1998. - С. 118.

57. Степанова Л.В., Цивилева О.М., Никитина В.Е., Лощинина Е.А., Гарибова Л.В., Тюрюкина Е.В. Гемагглютинирующая активность некоторых базидиальных ксилотрофов на стадии дикариотического мицелия // Микология и фитопатология 2006 - № 4. – С. 307-313.

58. Трувеллер К.А., Нефедов Г.И. Многоцелевой прибор для вертикального электрофореза в параллельных пластинках полиакриламидного геля // Научн. докл. высш. шк. биолог.науки. – 1974 - №9. – С. 137-140.

59. Фалина Н. Н. Тромболитическая активность в культуре штаммов *Flammulina velutipes* (FR) / Микол. и фитопатология, Т.14, №1, 1980 – С. 40-42.

60. Федотов О. В., Бойко М. И., Негруцький С. Ф., Материалы вузовской конференции професорско-преподавательского состава по результатам научно-исследовательской работы – Донецк, 1997 - Биология – С. 94-95.

61. Федотов О. В., Бойко М. І, Негруцкий С. Ф., Порівняльна характерристика грибів порядків *Tricholomatales* и*Agaricales*, Укр. бот. ж. Т.56, №2, 1999 – С. 197-201.

62. Федотов О. В., Бойко М. І, Негруцкий С. Ф., Зв'язані амінокислоти та білок ферментних препаратів молокозсідальної дії у афілофорових грибів / Укр. бот. ж. Т.59, №1, 2002 – С. 45-48.

63. Федотов О. В., Когут І. О., Бугрім Е. Ю. Молокозсідальна антиоксидантна активність групи *Sparassis erispa* (Fr) Fr / Учені записки Таврического національного університету імені В. І. Вернадського, 228-231.

64. Федорова Л.Н. Протеолитическая активность высших грибов в поверхностной и глубинной культуре // Микология и фитопатология 1973 - №6. - С. 542-544.

65. Федорова Л.Н., Шиврина А.Н. Протеазы “сычужного” действия в культурах высших грибов // Микология и фитопатология 1974 - №1. - С. 22-26.

66. Федорова Л.Н., Шиврина А.Н. Динамика протеолитической активности в культурах высших грибов // Микология и фитопатология 1975 - №4. - С. 307-310.

67. Федорова Л.Н., Дроздова Т.Н., Гаврилова В.П. Биосинтез молокосвертывающего фермента базидиальным грибом *Russula dekolorans* // Микология и фитопатология 1981 - №6. - С. 496-500.

68. Федорова Л.Н., Дроздова Т.Н. Влияние посевного материала на биосинтез молокосвертывающего фермента микоризным грибом // Микол. и фитопатол. – 1986. – Т. 20, вып. 6. – С. 499-502.

69. Феофилова Е. П. Современные направления в изучении биологически активных веществ базидиальных грибов / Прикладная биохимия, Т.34, №6, 1998 – 597-608.

70. Феофилова Е. П., Терешина В. М. Термофилия мицелиальных грибов с позиции биохимической адоптации к температурному стрессу (обзор), Ж. Прикладная биохимия и микробиология, Т. 35, 1999 – С. 546-556.

71. Феофилова Е. П. Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адоптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям / Прикладная биохимия и микробиология, Т.39, №1, 2003 – С. 5- 24.

72. Фильчаков Л. П., Бойко М. И., Негруцький С. Ф., Сычев П. А., Базидиальные грибы – перспективные объекты биотехнологии / Материалы доклада вузов конференции професорско-преподавательского состава по итогам научно-исследовательских и методических работ – Донецк, 1995 – С. 102-103.

73. Фізіологічно активні речовини: Зб. статей / Гол.рец. М. О. Лозинський. №1/31/2001 – Харків: НФАУ, 2001. – 88с.

74. Хауксворт Д.Л. Общее количество грибов, их значение в функции экосистем, сохранение и значение для человека / Микология и фитопаталогия, Т.26,1992 – С. 152-166.

75. Шагинян К.А., Алехина И.А., Денисова Н.П. Сериновая протеиназа из высшего базидиомицета рода *Coprinus* // Биохимия 1990 - №8. - С. 1387-1395.

76. Шаркова Т.С., Максимов В.Н. Изучение физиологии хищного гриба *Arthrobotrys longa* - продуцента лонголитина в связи с длительным хранением культуры в лабораторных условиях // Микология и фитопатология 1999 - №5. - С. 338-345.

77. Шубаков А. А., Кучерявых П. С. Хитиномитическая активность мицелеальных грибов / Прикладная биохимия и микробилогия, Т.40, 2004 – С. 517-519.

78 .Шугалей В. С., Кеслер Р. М. Ферментология. Изд-во Ростовск. Ун-та, 1986. – 96с.

79. Яковлев А. Ю., Боровский Г. Б., Пензина Т. А., Петров А. Н., Войников В. К. Влияние отрицательных температур на рост мицелия и жизнеспособность плодовых тел некоторых высших ксилотрофных базидиомицетов / Микология и фитопатология, Т.34, 2000 – С. 56-61.

80. BresinskyA. Zur Frageder taxonomischen Relevanzchemischer Merkmalebeihöheren Pilzen // Bull. mens. Soc. Linn. Numero spec. Lyon. – 1974. – Р. 61-84

81. Das A., Chatterjee M., Roy A. Enzymes of some higher fungi // Mycologia. - 1979 - 3. - Р. 530-536.

82. Kalisz H.M., Wood D.A., Moore D. Образование, регуляция и проявление экстрацеллюлярной протеиназной активности у базидиомицетных грибов // Trans. Brit. Mycol. Soc. - 1987 - 2. - С. 221-227.

83. Kawai Masanobu. Образование протеолитических ферментов и распространение способности свертывать молоко среди *Basidiomycetes* // Nippon nogei kagaku kaishi. - J. Agr. Chem. Soc. Jap. - 1973 - 8. - С. 467-472.

84 .Kawai Masanobu Сравнение продуктивности некоторых гидролаз среди представителей систематической группы *Basidiomycetes* // Nippon nogei kagaku kaishi. - J. Agr. Chem. Soc. Jap. - 1973 - 10. - С. 633-637.

85. Kobayaschi Fumia, Yabuki Minoru, Hoshino Kazuo, Sakamoto Masayoshi. Isolation and characterization of *Trametes ostreiphormis* K-1, and purification and properties of milk-clotting enzyme produced by the fungus // Nippon nogei kagaku kaishi. - J. Agr. Chem. Soc. Jap. - 1975 - 2. - Р. 81-92.

86. Klan Jaroslaw, Baudisova Dana. Enzyme activity of mycelial cultures of saprotrophic macromycetes (*Basidiomycotina* and *Ascomycotina*). Methods of oxidoreductases ensimation // Ces. mycol. - 1990 - 4. - Р. 212-219.

87. Miersch Reinbothe H. Uber das Vorcommen differenter Ureohydrolasen in Pilzfruchtkorpern von *Panus tigrinus* (Buul ox Fr.) Sing. // Biochem. und Physiol. Pflanz. - 1971 - 1. - P.75-89.

88. Nerud F., Misurcova L., Musilek V. Production of milk-clotting enzymes by basidiomycetes // Folia microbiol. - 1989 - 4. - p.311-315.

89. Ramstedt Mauritz, Soderholl Kennet. Protease, phenoloxidase and pectinas activities in mycorrhizal fungi // Trans. Brit. Mycol. Soc. - 1983 - 1. - P.157-161.

90. Shannon John W. Starch gel electrophoresis of enzymes from nine species of *Polyporus* // Amer. J. Bot. - 1973 - 1. - P.96-100.

91. Tsujisaka Y., Hamada N., Kobayashi R. Purification and some properties of an exo-β-1,3-glukanase from *Basidiomycetes* species // Agr and Biol. Chem. - 1981 - 5. - P.1201-1208.

92. Venables C.E., Watkinson S.C. Production and localization of proteinases in colonies of timber-decaying *Basidiomycetes* fungi // J. Gen. Microbiol. - 1989 - 5. - P.1369-1374.

93. Wetter Janos. A Pleurotus fajor sejten kivuli proteaz termereserol // Mycol. kozl. - 1984. - 23. - P.103-114.

94. Zhu Hong, Guo Da-Cheng, Dancik, Bruce P. Purification and characterization of an extracellular acid proteinas from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* // Appl. and Environ. Microbiol. - 1990 - 4. - P.837-843.

Хилинская Алиса Евгеньевна

**Комплексная тема:** «Физиолого-биохимические исследования базидиальных грибов – перспективных объектов биотехнологии»

**«Влияние режимов культивирования на молокосвертывающую активность штаммов *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.»**

Научные руководители:

к.б.н., доц. Штирц Ю.А.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

старший препод. Загнитко Ю.П.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Работа подана « » \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2023 г.

Объем работы \_\_\_\_ стр. машинописи,

в тексте \_\_\_\_ таблицы, \_\_\_\_ рисунков

Защита состоялась « » \_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2023 г.

Протокол ГЭК биологического факультета

№ \_\_\_\_от « » . .2023г.