

В. И. Билай

Биологически активные вещества микроскопических грибов и их применение

Наукова думка

КИЕВ
1965

ВВЕДЕНИЕ

Перед современной биологической наукой поставлена чрезвычайно важная по существу и назначению задача — познание сути жизненных явлений. Ее разрешение предполагает изучение процессов метаболизма, связанного с выяснением роли различных биологически активных веществ в процессах обмена веществ. Биологически активные вещества представляют собой высокомолекулярные сложные соединения, выполняющие с чрезвычайно высокой степенью активности и специфичности каталитические, биотические, абиотические и другие функции в жизнедеятельности организмов. Многие из них как в живом организме, так и будучи выделены из него или синтезированы, воспроизводят соответствующие химические превращения веществ в очень низких концентрациях. К этим соединениям относятся ферменты, витамины, гормоны, ингибиторы и стимуляторы роста животных и растений, аминокислоты и ряд других веществ.

Микроскопические мицелиальные грибы, как и другие микроорганизмы, представляют собой неисчерпаемый источник получения различных биологически активных веществ и весьма благодарный объект для изучения многих вопросов обмена веществ. Метаболизм микроорганизмов зависит в значительной мере от условий культивирования, при котором может использоваться значительное число разнообразных веществ в качестве источников углеродного, азотного, витаминного и минерального питания.

Условия культивирования определяют направленность экзоэндогенных процессов биосинтеза определенных метаболитов. При этом нельзя особо не отметить чрезвычайно важную биологическую особенность многих видов микроорганизмов — обильно выделять в окружающую среду ферменты (которые преобразуют ее коренным образом) и другие метаболиты в количестве, значительно превышающем потребности самих микробов. Это поистине изумительное их свойство до настоящего

времени почти не раскрыто наукой. А между тем, в его изучении лежит основа для использования огромной биосинтетической деятельности микроорганизмов, в том числе микромицетов.

Микроскопические мицелиальные грибы имеют в данном отношении ряд преимуществ по сравнению с другими микроорганизмами — они менее требовательны к питательному субстрату и прочим условиям среды. Однако, несмотря на то, что отдельные их виды издавна применяются как продуценты ферментов, органических кислот, изучены они недостаточно. Открытие и практическое использование пенициллинов в последние два десятилетия привлекло внимание исследователей к более широкому изучению метаболизма микроскопических грибов.

Установлены и используются многие их биосинтетические свойства, например, для получения ферментов, антибиотиков, гормональных препаратов, витаминов, органических кислот и пр.

Достижения и методы современной физики, химии и техники являются основой для создания новой отрасли микробиологической промышленности, использующей при получении ряда препаратов биологические особенности различных микроорганизмов.

Успешное развитие микробиологической промышленности немыслимо без глубокого и всестороннего изучения биологических свойств, химизма жизнедеятельности многообразных видов микроорганизмов в зависимости от различных условий культивирования.

Предлагаемая работа является попыткой автора обобщить результаты исследований по образованию микроскопическими мицелиальными грибами биологически активных веществ. Нельзя, однако, не отметить, что быстро возрастающее число публикаций по данному вопросу значительно затрудняет осуществление этой задачи. В связи с тем, что материалы по биосинтезу антибиотиков микромицетами нами уже были обобщены («Микроскопические грибы — продуценты антибиотиков», Изд-во АН УССР, К., 1961), в настоящей книге этот вопрос не затрагивается. По аналогичным соображениям не освещается также биосинтез грибами стимуляторов роста растений (гиббереллинов и др.).

В предлагаемой работе приведены данные о биосинтезе ферментов, аминокислот, токсинов и некоторых других веществ разными видами микромицетов.

Излагаемый материал содержит краткую характеристику современных представлений о химической природе используемых грибами субстратов, описание основных условий биосинтеза, методов изоляции веществ и указание областей их использования. Библиография, приводимая в каждом разделе, содержит основные литературные источники, большинство которых

в той или иной степени упоминается в тексте. Наряду с этим считаем полезным указать отдельные монографии и обобщающие статьи отечественных и зарубежных авторов, посвященные как общим вопросам физиологии и биохимии, так и конкретно касающиеся высших растений, бактерий, грибов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беккер З. В. Физиология грибов. Изд-во АН СССР, М., 1963.
2. Генкель П. Физиология растений с основами микробиологии. Учпедгиз, М., 1962.
3. Горленко М.— Работы Л. И. Курсанова в области физиологии грибов. Физиология раст., 1957, 4.
4. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. ИЛ, М., 1961.
5. Иерусалимский Н. Основы физиологии микробов. Изд-во АН СССР, М., 1963.
6. Имшенецкий А. Актуальные задачи микробиологии. Вестн. АН СССР, 1963, 3.
7. Клюйвер А., Ван-Ниль К. Вклад микробов в биологию. Пер. Ю. Лашкевича. ИЛ, М., 1959.
8. Кочетков Н., Торгов И., Ботвинник М. Химия природных соединений (углеводы, нуклеотиды, стероиды, белки). Изд-во АН СССР, М., 1961.
9. Кретович В. Основы биохимии растений. Изд. 4. «Высш. школа», М., 1964.
10. Кретович В. Современные представления о природе действия ферментов.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1961.
11. Курсанов А. Современная физиология растений и перспективы ее развития.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1961, 2.
12. Лилли В., Барнетт Г. Физиология грибов. ИЛ, М., 1953.
13. Михлин Л. Биохимия клеточного дыхания. Изд-во АН СССР, М., 1960.
14. Пидопличко Н. Микофлора грубых кормов. Изд-во АН УССР, К., 1953.
15. Пошон Ж., д.-Баржак Г. Почвенная микробиология. Пер. В. Шорина. ИЛ, М., 1960.
16. Робертис Е., де-Новинский В., Саэс Ф. Общая цитология. Пер. В. А. Дорфман. ИЛ, М., 1962.
17. Фостер. Химическая деятельность грибов. Пер. Бражниковой, под ред. Г. Гаузе. ИЛ, М., 1950.
18. Метаболизм бактерий. Пер. В. Шорина, Е. Кругляк, Н. Певзнер, Т. Успенского. ИЛ, М., 1963.
19. Cochrain. Physiology of fungi.— Proc. Symp. Chem. a. Biochem. of Fungi a. Yeats. Dublin, 18—20.VII 1963 — Pare and Appl. Chem., 7, I—V.

I. ФЕРМЕНТЫ

КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

Ферменты — это белки, обладающие высокой каталитической и специфической активностью в осуществлении многообразных реакций превращения веществ и энергии. Они играют исключительно важную роль в процессах жизнедеятельности организмов, осуществляя обмен веществ, процессы ассимиляции и диссимиляции их.

Однако не только в организме, но и выделенные в чистом виде ферменты при определенных условиях являются катализаторами разнообразных превращений, имеющих большое значение в различных отраслях практической деятельности.

Исследования ферментативных свойств микроорганизмов развиваются главным образом в двух направлениях. С одной стороны, выясняется их роль для организма человека, животных, растений, а также в патогенезе вызываемых микроорганизмами заболеваний. С другой,— выявляются возможности использования их в микробиологической промышленности для осуществления разнообразных процессов превращения веществ. Многочисленные данные показывают, что ферментативный процесс превращения многих веществ имеет преимущества перед химическим гидролизом, окислением и т. д.

Ферментативные реакции характеризуются быстротой течения, специфичностью превращения определенных звеньев химической структуры вещества.

В последнее время в области изучения ферментов достигнуты значительные результаты и расширены сведения о химическом строении и механизме действия многих из них. Значительно возросло число ферментов, полученных в очищенном и кристаллическом виде. Так, если в 30—40-х годах было известно только несколько кристаллических ферментных препаратов (уреаза, пепсин и др.), то теперь их свыше 60—70 из общего количества до 850 описанных ферментов.

Согласно современным представлениям, большинство ферментов имеет двухкомпонентную структуру, т. е. состоит из активной группы и носителя, но есть также однокомпонентные ферменты, состоящие только из белка, в которых роль активной группы принадлежит определенным химическим группи-

ровкам (фенольные группы тирозина в пепсине, сульфгидрильные группы и т. д.).

Химическая природа активной группы ферментов определяет характер осуществляемых каталитических процессов. В качестве соединений, входящих в состав активной группы ферментов, могут быть витамины (B_1, рибофлавин, никотинамид, пантотеновая, фолиевая кислоты, биотин, пиридоксальфосфат), нуклеотиды и другие сложные вещества, играющие роль в процессах обмена.

Получение кристаллических препаратов ферментов и изучение их химической природы способствовало выяснению многих вопросов механизма каталитической активности их. Высокая степень каталитической активности ферментов обуславливается значительным понижением энергии активации вещества, вступающего в реакцию благодаря образованию промежуточных неустойчивых соединений (субстрат—фермент). В этих соединениях ослабляются внутримолекулярные связи и они становятся более доступны для ферментативных превращений. Каталитическая активность фермента зависит от быстроты освобождения его из комплекса субстрат—фермент («быстрота оборотов» фермента). Каталитическая активность, т. е. быстрота превращения субстрата единицей фермента, для разных ферментов неодинакова, она зависит от температуры, pH, концентрации субстрата, его химического строения и свойств, а также многих других факторов (Кретович, 1964).

Классификация ферментов носит несколько условный характер. В ее основу в качестве главного признака положен характер химических реакций при взаимодействии с определенным субстратом. Условность классификации проявляется также и в том, что быстрое развитие ферментологии, получение новых данных изменяет и значительно расширяет представление о свойствах ферментов и характере действия их на субстраты. Как установлено в последнее время, многие ферменты обладают не только, например, гидролитическими свойствами, но также трансферирующими в отношении определенных химических групп. Ниже приводим перечень основных групп ферментов (по Кретовичу, 1964).

1. **Гидролазы.** Катализируют при участии воды расщепление различных сложных органических соединений (т. е. осуществляют процесс гидролиза по схеме $RR' + H—OH \rightleftarrows R \cdot OH + H \cdot R'$). К ним относятся:

а) эстеразы, расщепляющие и синтезирующие сложные эфиры; липазы, расщепляющие и синтезирующие жиры до высокомолекулярных жирных кислот; танназы, расщепляющие и синтезирующие сложные эфиры с фенольными гидроксилами в кислотном компоненте; пектин-эстеразы, расщепляющие пектин с образованием полигалактуроновой кислоты

и метилового спирта; фосфатазы, расщепляющие сложные эфиры фосфорной кислоты; сульфатазы, расщепляющие сложные эфиры серной кислоты;

б) карбогидразы, гидролизующие и синтезирующие глюкозиды, ди-, три- и полисахариды по связи $\rightarrow C-O-C\leftarrow$; олигазы, расщепляющие α- и β-гликолизидную связь в дисахаридах и гликозидах [α-глюкозидаза, β-глюкозидаза, α-галактозидаза (лактаза), β-фруктозидаза (инвертаза)]; полиазы, расщепление α- и β-связи простых и сложных полисахаридов (амилазы, целлюлазы, гемицеллюлазы, полигалактуроназы);

в) амидазы, катализирующие превращения амидов; уреазы, расщепляющие мочевину; аспарагиназа, глютаминаза, гидролизующие соответственно аспарагиновую и глютаминовую кислоты; аргиназы, гидролизующие аргинин и др.;

г) протеазы, гидролизующие и синтезирующие белки и пептиды; протеиназы, преимущественно гидролизующие белки с образованием пептидов и аминокислот (пепсин, трипсин, химотрипсин, химозин, папаиназы); пептидазы, расщепляющие преимущественно концевые пептидные связи с образованием аминокислот (дипептидазы, аминопептидазы, карбоксипептидазы, пролиназы и др.).

2. **Фосфорилазы.** Катализируют расщепление при участии фосфорной кислоты (т. е. фосфоролиз).

3. **Ферменты расщепления.** Катализируют реакции по уравнению $R-R \rightleftarrows R+R_1$ (отщепление воды, CO_2, NH_4 и др.).

4. **Окислительно-восстановительные ферменты.**

$$AH_2 + B \rightleftarrows A + BH_2$$

дона- акцеп-
тор тор

Окисление A
Восстановление B

5. **Ферменты переноса** (ферразы). Катализируют перенос целых атомных группировок от одного соединения к другому.

$$\text{АТФ} + \text{глюкоза} \xrightleftharpoons{\text{фосфофераза}} \text{глюкозо-6-фосфат} + \text{АДФ}.$$

$$\text{глюкозо-6-фосфат} + \text{АТФ} \xrightleftharpoons{\text{фосфотрансфераза}} \text{глюкозо-1,6-дифосфат} + \text{АДФ}$$

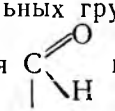
АТФ — аденозинтрифосфат;

АДФ — аденозандифосфат.

Согласно классификации Диксона и Уэбба (1961), ферменты представлены двумя основными группами: ферментами гидролиза (гидролазы) и ферментами переноса (трансферазы). К первой группе относятся ферменты, гидролизующие различные типы связей в молекуле субстрата: —CO—NH—, аминные, сложноэфирные, гликозидные, кислотных ангидридов, реакции

неокислительного декарбоксилирования и др. Ко второй принадлежат ферменты, осуществляющие перенос водорода, азотсодержащих, фосфатных, ацильных, гликозильных, метильных групп и др. Отдельную группу составляют разные ферменты, в частности осуществляющие реакции синтеза, связанные с распадом АТФ, ГТФ и др. Ферменты, осуществляющие гидролиз полисахаридов, относятся, по упомянутой классификации, к гидролазам.

Исключительно важную роль в процессах жизнедеятельности растительных и животных организмов, синтеза и распада различных веществ, осуществляемых при этом, играют углеводы. Они являются источником энергии, структурными и резервными веществами, выполняют ряд других разнообразных функций. По химическому строению и свойствам их разделяют на две большие группы: моносахариды и полисахариды.

Моносахариды содержат атомы углерода в соединении с гидроксильными спиртовыми группами в соотношении, равном их соотношению в воде, т. е. на один атом углерода приходится два атома водорода и один атом кислорода (отсюда и их название — углеводы). Кроме гидроксильных групп, в молекуле моносахаридов содержится альдегидная  или кетонная $=C=O$ группа, и по этому признаку они делятся на альдозы и кетозы. Названия отдельных моносахаридов определяются числом атомов углерода: триозы содержат три его атома, тетраозы ($C_4H_8O_4$) — четыре, пентозы ($C_5H_{10}O_5$) — пять, гексозы ($C_6H_{12}O_6$) — шесть, гептозы ($C_7H_{14}O_7$) — семь атомов углерода в молекуле. Наиболее распространены в природе и изучены гексозы, типичным представителем которых является глюкоза. Изучение химического и пространственного (стереохимического) строения, многообразных превращений показало, что свойства моносахаридов весьма разнообразны.

Молекула глюкозы содержит асимметрические атомы углерода, у которых все валентности замещены различными атомными группами, и образует стереоизомеры, отличающиеся физико-химическими свойствами. Установлено, что стереоизомерия, т. е. принадлежность к D- или L-ряду, определяется положением углеродного атома по отношению к карбонильной и первичной спиртовой группе. В случае глюкозы — это пятый атом углерода. Таким образом, ряд может иметь несколько изомерных соединений. В случае глюкозы — это $2^4=16$.

Многообразие превращений моносахаридов обусловлено также циклическим строением. Циклические формы глюкозы образуются путем присоединения атома кислорода между первым и пятым атомами углерода (пираноза) или первым и четвертым

атомами углерода (фураноза) в молекуле глюкозы. Подобные особенности строения и свойств установлены также для других моносахаридов — пентоз, триоз.

Устойчивые в кристаллическом состоянии, моносахариды в растворах превращаются в изомерные формы, проявляя так называемую мутаротацию: в растворах моносахарид (глюкоза) может быть в виде одной альдегидной формы, двух аномерных пиранозных и двух аномерных фуранозных форм. Моносахариды обладают исключительной реактивной лабильностью и образуют многочисленные производные по карбонильной группе, спиртовым гидроксилам, гликозидному гидроксилу и др., которые описаны как при изучении природных, так и синтезированных соединений (рис. 1).

Ферментативные превращения моносахаров в организме происходят также многообразными путями и сопровождаются образованием большого числа соединений начальных, промежуточных и конечных этапов превращений. Эти реакции катализируются многочисленными ферментами и их системами. Наиболее обстоятельно они изучены при обмене веществ в организме человека, животных, в меньшей степени — растений. Последние годы уделяется большое внимание изучению ферментативного превращения углеводов, в том числе моносахаридов, бактериями. Имеются исследования с отдельными видами микроскопических грибов.

Соединением (конденсацией) остатков одинаковых или разных моносахаридов с отщеплением соответствующего числа молекул воды образуются полисахариды [$n C_6H_{12}O_6 - (n-1)H_2O \rightarrow$ полисахарид]. По числу соединенных молекул моносахаридов различают дисахариды, содержащие два остатка моносахаров, олигосахариды — от двух до 8—10 и полисахариды, содержащие большее число моносахаридных единиц.

Полисахариды — одна из наиболее распространенных групп природных биологически важных соединений. Природные полисахариды — высокомолекулярные соединения, содержащие в отдельных случаях до нескольких тысяч сахарозных единиц. К ним относятся вещества, играющие роль запасных или питательных, как крахмал, синтезируемый высшими растениями, гликоген, образуемый у животных и грибов, инулин — у ряда растений, а также вещества, составляющие основу клеточных оболочек и тканей,— целлюлоза, пектин, хитин, ксилан, многие специфические полисахариды микроорганизмов, плазмы крови и др. По химической структуре полисахариды состоят из полимерной цепи, в которой углерод—углеродные связи закономерно прерываются атомами кислорода (Кочетков и др., 1961).

Изучение химии полисахаридов, их строения представляет одну из сложнейших задач органической химии. Но, несмотря на это, здесь имеются значительные успехи, позволившие уточ-

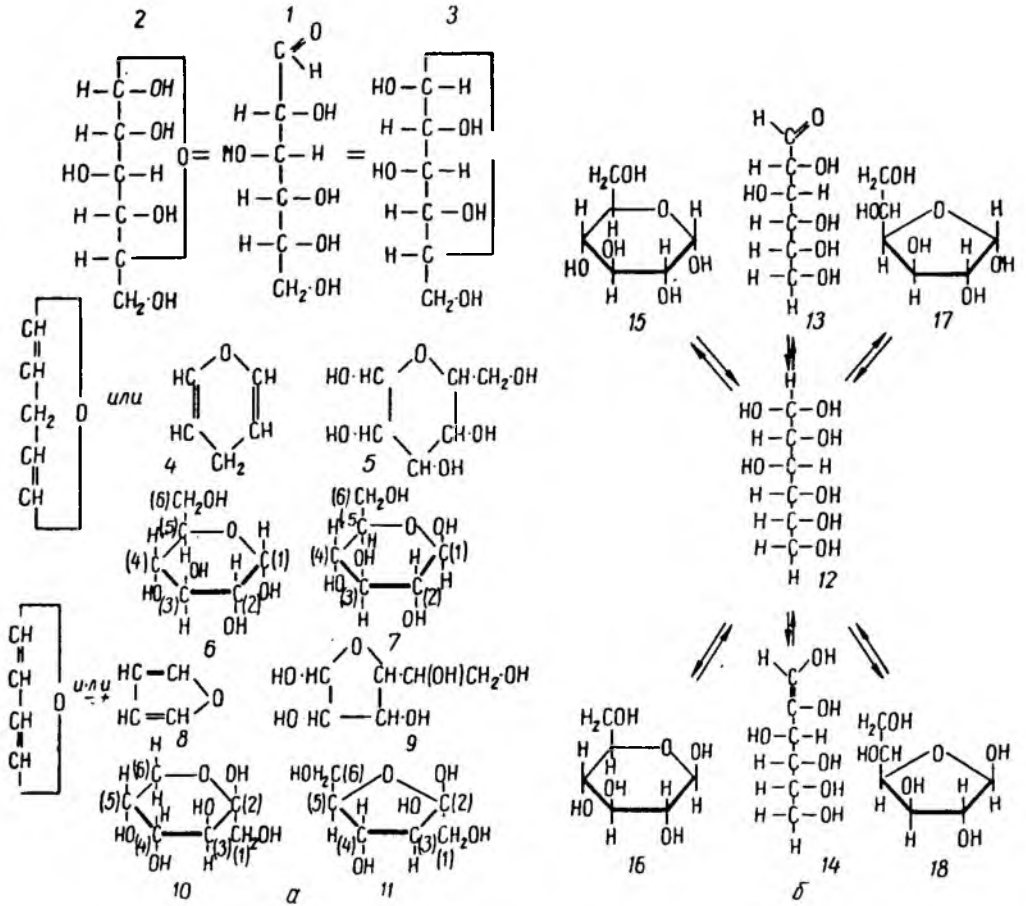


Рис. 1. Строение различных форм глюкозы (по Кретовичу):

а — 1 — Д-глюкоза, *2* — α-Д-глюкоза, *3* — β-Д-глюкоза, *4* — пиран, *5* — пираноза, *6* — α-Д-глюкопираноза, *7* — β-Д-глюкопираноза, *8* — фуран, *9* — глюкофураноаа, *10* — α-Д-фруктопираноза, *11* — β-Д-фруктофураноза; *б* — мутаротация глюкозы в растворе: *12* — гидратная форма, *13* — оксоформа, *14* — енольная форма, *15* — α-пираноза, *16* — β-пираноза, *17* — α-фураноза, *18* — β-фураноза.

нить химическую характеристику и строение многих природных биологически важных полисахаридов, изучить состав входящих в их молекулу сахаров, их число, характер связей и т. д.

Среди полисахаридов различают гомополисахариды, цепь которых состоит из одного мономера — моносахарида, и гетерополисахариды, в полимерной цепи которых могут в различных сочетаниях чередоваться два или более различных моносахаридов.

В процессе обмена веществ растительных и животных организмов, так же как и в процессе разложения продуктов, кормов и органических остатков в почве и других природных местообитаниях, полисахариды претерпевают разнообразные превращения, вызываемые ферментами микробного, в том числе грибного происхождения. Как известно, многие из последних издавна используются в народной практике — хлебопечении, производстве молочных продуктов, напитков и т. п.

Ферментативный гидролиз полисахаридов, таких, как крахмал, целлюлоза, пектин и др., осуществляется многими видами грибов.

АМИЛАЗЫ

Амилазы — ферменты, гидролизующие крахмал. Крахмал представляет собой комплексное соединение и состоит из двух полисахаридов: амилозы (20—30%) и амилопектина (70—80%). Эти компоненты могут быть разделены путем осаждения амилозы бутанолом, нитрометаном (с последующим удалением растворителя). Молекулярный вес амилозы около 50 000; она содержит до 300 глюкозных остатков в полимерной цепи. Значительно более сложный состав и строение амилопектина. Считают, что основной единицей цепи амилопектина также являются остатки глюкозы, связанные β-1, 4-глюкозидной связью, но с наличием ответвлений в полимерной цепи, число и последовательность которых еще не вполне выяснены (Кочетков и др.) (рис. 2). Амилоза окрашивается йодом в синий цвет, амилопектин — в красно-фиолетовый.

Крахмал — один из наиболее распространенных в природе углеводов, содержится в различных количествах во многих видах растений и играет большую роль в обмене веществ растительных организмов, являясь запасным энергетическим материалом. Велико его значение и как одного из основных питательных веществ для животного организма.

Крахмал разных видов и сортов растений отличается формой зерен, размером, строением и некоторыми свойствами. Так, например, крахмал разных сортов кукурузы отличается температурой клейстеризации; пшеницы — вязкостью растворов в мочевине; гороха, риса — соотношением амилопектина и

амилозы (наличие последней определяет быстроту развариваемости риса). В неодинаковой степени он подвержен ферментативному гидролизу, имеет различную «атакуемость» амилазами.

Известен комплекс амилаз, производящих расщепление крахмала:

α-Амилаза — гидролизует α-1,4-глюкозидные связи полимерной цепи молекулы крахмала с образованием мальтозы и конечных декстринов. Ферментные очищенные препараты получены у *Asp. awamorii, Asp. candidus* v. *amyloliticus, Asp. niger, Rhizopus delemar* [32, 33, 46, 50, 63, 67, 68, 89].

Глюкоамилаза — отщепляет отдельные глюкозные единицы от нередуцированного конца α-1,4-глюкозидных свя-

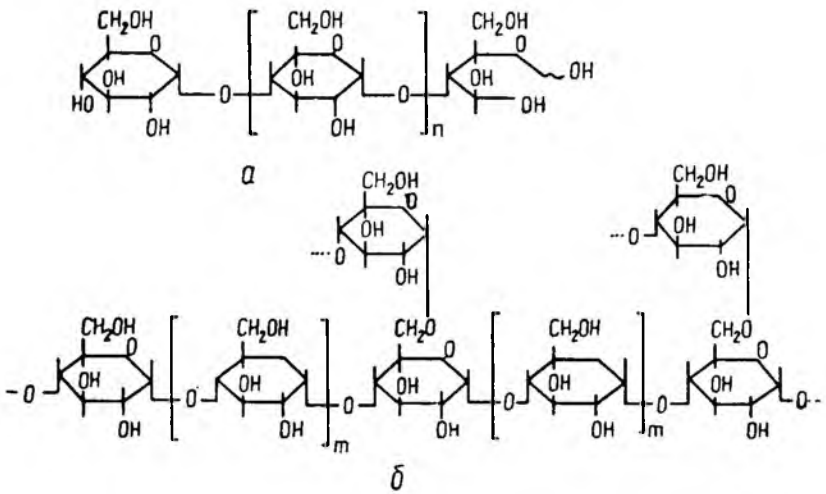


Рис. 2. Строение компонентов крахмала (по Кочеткову и др.):
а — амилоза; *б* — амилопектин.

зей. Гидролиз крахмала сопровождается образованием глюкозы, иногда — α-олигосахаридов. Очищенные препараты получены у *Asp. niger, Asp. oryzae, Rhizopus delemar*. Некоторые из указанных видов образуют трансгликозидазы, обладающие также активностью в отношении гидролиза 1,6-глюкозидных связей [33, 56, 60, 63, 72, 74, 75, 77—81].

α-Глюкозидаза (мальтаза) — гидролизует дисахарид мальтозу.

Олиго-1,6-глюкозидаза (декстриназа) — расщепляет α-1,6-глюкозные связи в изомальтозе, панозе, конечных декстринах; наиболее подробно изучена у *Asp. oryzae, Asp. awamorii* v. *fumeus* [87, 63].

α-Глюкозилтрансферазы — превращают мальтозу в глюкозу, панозу, изомальтозу, высшие олигосахариды (неак-

тивны на крахмале и конечных декстринах); превращают мальтоолигосахариды в глюкозу, мальтозу, панозу и синтезируют изомальтозу, панозу и мальтоолигосахариды из мальтозы.

Процесс ферментативного гидролиза крахмала и роль в нем отдельных амилолитических ферментов недостаточно ясны [61, 63, 70].

Для большинства грибов различных систематических групп крахмал является хорошим источником углерода. Растворимый крахмал — частично деполимеризованное путем кислотного гидролиза производное крахмала — нередко используется грибами лучше, чем нативный крахмал. Сырой крахмал, если структура зерна не разрушена автоклавированием, не может быть использованным отдельными видами грибов, он также не гидролизуется очищенной амилазой.

Несмотря на то, что большинство видов микроскопических грибов использует крахмал в качестве источника углерода, т. е. образует амилазы, сравнительных исследований по характеристике амилолитических свойств их не проведено. В основном изучались амилазы отдельных видов рода *Aspergillus*, главным образом *Asp. oryzae, Asp. niger,* а также *Rhizopus* (*Rh. delemar, Rh. japonicum*). Это объясняется тем, что указанные грибы издавна широко применяются в практике, например в Японии для изготовления продуктов питания из риса, сои и др., а также спиртных напитков. Как продуцент осахаривающей амилазы *Asp. oryzae* нашел применение во многих странах в спиртовой промышленности. Однако в том и другом случаях источником амилаз и других ферментов служили культуры этих видов грибов, выращенные на отрубях. В этих условиях упомянутыми видами грибов образуется комплекс амилолитических, протеолитических и некоторых других ферментов, который не всегда желателен для отдельных процессов производства, а в некоторых случаях даже вреден. Так, например, для хлебопечения существенно необходима α-амилаза и совсем нежелательны протеолитические ферменты этого комплекса, а в пивоварении может быть эффективен комплекс амилолитических и протеолитических ферментов.

Условия образования, методы выделения, очистки, свойства и активность амилаз указанных видов грибов, а также способы их применения изучались многими авторами.

В связи с возрастающим практическим использованием амилаз и развитием новых методов изучения ферментов, позволяющих получать высокоочищенные и кристаллические препараты, исследовались амилолитические свойства как используемых в практике видов грибов, так и новых, активных продуцентов амилазы. Результаты этих исследований, проведенных в разных странах, были предметом обсуждения на ряде международных съездов и симпозиумов.

Сравнительное изучение амилолитической активности музейных и выделенных из почвы штаммов *Asp. oryzae* и *Asp. niger* проведено Фениксовой [46] (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика амилолитических свойств разных культур двух видов *Aspergillus*

Название вида и номер штамма	Активность амилолитических ферментов, ед. на 1 *г* сухой культуры			
	АС	ОС	ДС	МА
Asp. oryzae M . . .	38,4	12,8	0,83	26,5
« » 28 . . .	32,9	13,4	0,79	10,2
« » 10_2 . .	38,8	11,6	0,84	17,8
« » K_i . .	41,4	12,5	0,75	25,1
Asp. niger S . . .	1,48	1,07	0,60	65,9
« » 5i . . .	2,12	0,86	0,44	55,8
« » 6i . . .	1,54	1,35	0,71	78,0
« » 8i . . .	1,81	1,52	0,79	72,2

АС — амилолитическая способность, ОС — осахаривающая способность, ДС — декстриногенная способность. МА — мальтазная активность.

Как видно из приведенных данных, *Asp. oryzae* образует значительно более активную амилазу, чем *Asp. niger* (32—41 ед. на 1 *г* сухой культуры гриба против 1,5—2 ед.). В то же время последний образует мальтазу гораздо активнее, чем разные культуры *Asp. oryzae* (55—78 ед. против 10—26). Автор указывает, что адсорбцией на силикагеле можно разделить амилолитический комплекс гриба *Asp. oryzae* и получить ферментные препараты, обладающие незначительной амилолитической, но высокой декстриназной и мальтазной активностью.

Комплекс амилолитических ферментов *Asp. oryzae* и *Asp. niger* исследован Пэйжюэ с сотрудниками. Так, было установлено [76], что *Asp. oryzae,* так же как и *Asp. niger,* образует фермент трансглюкозидазу. Этот фермент синтезирует из мальтозы изомальтозу, панозу, декстранпориозу, тетрасахарозу. В опытах авторов был очищенный препарат фермента, полученный из осажденного спиртом водного экстракта культуры *Asp. oryzae* на отрубях. Анализ продуктов ферментативного гидролиза производился при помощи бумажной хроматографии, а также выделением и последующим изучением их свойств. В качестве субстратов использовались мальтоза и глюкозо-1-фосфат. Олигосахариды, синтезированные трансглюкозидазой *Asp. oryzae* из мальтозы, содержали α-1,6 связи. Используя меченную C^{14} глюкозу в реакционной смеси, авторы показали, что фермент осуществляет перенос глюкозидных еди-

ниц из 1,4 к 1,6 связям. Таким образом, наряду с амилазами у этих видов грибов обнаружен фермент — трансглюкозидаза, осуществляющий синтез новых соединений 1,6-олигосахаридов из мальтозы.

Представляют также интерес исследования [78—80] по изоляции и изучению действия амилоглюкозидазы *Asp. niger*. Амилоглюкозидаза, образуемая грибом наряду с α-амилазой и мальтазой, обладает способностью почти полностью превращать крахмал и мальтоолигосахариды в глюкозу. Очищенный препарат амилоглюкозидазы авторами получен путем хроматографии на колонке ДЕАЕ-целлюлозы концентрата неочищенных ферментов *Asp. niger*. Фракционированная элюция — промыванием 500 *мл* 0,05 М лимоннокислым двунатрийфосфатным буфером pH 8,0, затем pH 6,0 и pH 4,0. Установлено, что амилолитическая активность фракции при pH 6,8—7,3 относится к α-амилазе, а при pH 6,0 и 4,5—5,2 — к амилоглюкозидазе. Два препарата амилоглюкозидазы в опытах авторов отличались по отношению к температуре, подвижности на бумажном электрофорезе, но преобладал фермент при pH 4,5—5,2, который и использовался для дальнейшей очистки и изучения. Повторным электрофорезом на бумаге было установлено, что амилоглюкозидаза, которая элюировалась при pH 4,6—5,0 из колонки, была гомогенна (рис. 3).

Изучены некоторые физико-химические свойства: 1) отношение к температуре. Фермент при нагревании до 50° С в течение 30 *мин* и быстром охлаждении до 30° инактивируется на 20%; при 60° соответственно — на 58%; 2) отношение к pH. Максимум активности при pH 4,8; 50% инактивации при pH 3,0 и 6,5; 3) субстратная специфичность. Крахмал превращает в глюкозу на 85%, амилопектин — на 98%, амилодекстрин — на 93%. На всех стадиях гидролиза очищенным ферментом от 1, 2, 4, 8, 24 часов образуется только глюкоза. Фермент гидролизует также мальто-олигосахариды, образуемые при гидролизе крахмала, но не обладает трансглюкозолитическими свойствами (в продуктах гидролиза не обнаружены изомальтоза, паноза и др.).

Трансглюкозидаза *Asp. niger* в опытах авторов была отделена от других карбогидраз гриба хроматографией и адсорбцией на ДЕАЕ-целлюлозе, крахмале и карбоксиметилцеллюлозе с последующей очисткой электрофорезом и ультрацентрифугированием.

При фракционном эллюировании из целлюлозной колонки фосфатноцитратными буферными растворами с разным значением pH (8,0; 6,0; 4,0) были получены отдельные ферменты амилолитического комплекса гриба. Анализ продуктов гидролиза при действии этих фракций на крахмал и мальтозу показал, что амилаза присутствует во фракции с pH 7, амилоглюко-

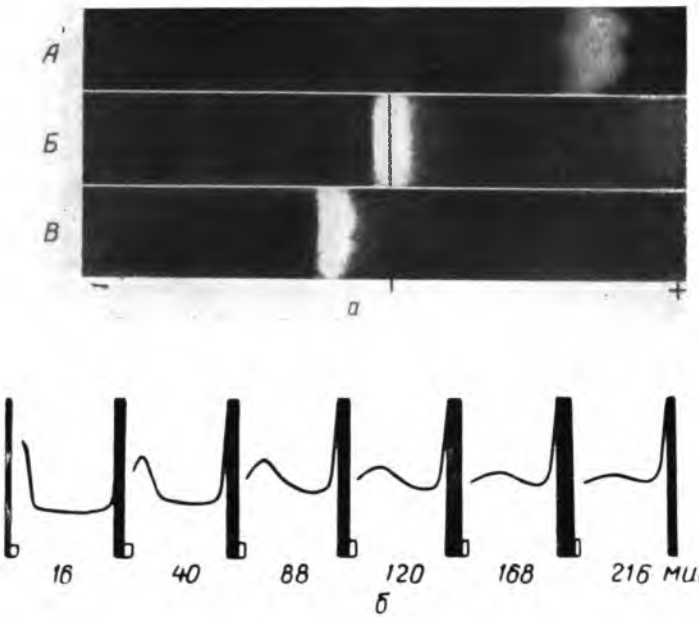


Рис. 3. Карбогидразы *Aspergillus niger* (по Pazur):
а — подвижность при электрофорезе на бумаге: амилоглюкозидаза (*А*), амилаза (*Б*), трансглюкозидаза (*В*); *б* — скорость осаждения (седиментации) очищенной трансглюкозидазы.

зидаза — при pH 6,0 и 4,8, а трансглюкозидаза — во фракции с pH 8,0. Дальнейшая очистка трансглюкозидазы *Asp. niger* проводилась повторной адсорбцией на ДЕАЕ-целлюлозе с pH 8 дважды, на обезжиренном кукурузном крахмале и карбоксиметилцеллюлозе (pH 4,5). Затем раствор был концентрирован и при pH 3,5 сохранялся без значительной потери активности.

Электрофорез показал, что препарат трансглюкозидазы является гомогенным. В опытах авторов при определении его активности на растворах мальтозы, крахмала и изомальтозы установлено, что трансглюкозидаза *Asp. niger* действует на три субстрата, т. е. обладает гидролитической и трансферирующей активностью. Наибольшая активность фермента при pH 3,5 (табл. 2).

Таблица 2

Влияние pH на ферментативную активность трансглюкозидазы *Asp. niger*
(100% — наивысшая активность при pH 3,5)

pH	Соединения		
	Мальтоза	Изомальтоза	Крахмал
2,0	51	50	57
2,5	78	68	73
3,0	84	83	82
3,5	100	100	100
4,0	73	82	79
4,5	56	60	56
5,0	51	44	47
6,0	21	—	18

Действие на мальтозу. Реакционная смесь: 0,1 *мл* 0,3 М раствора мальтозы, буфферированного до pH 3,5+0,1 *мл* раствора трансглюкозидазы, при 30° С. Продукты реакции изучали хроматографически (система н-бутиловый спирт : пиридин : : вода — 6 : 4 : 3) через 0, 2, 4, 8, 16 часов.

Опыты показали, что мальтоза быстро гидролизуется до глюкозы и в течении гидролиза обнаруживаются в реакционной смеси изомальтоза, паноза, т. е. фермент обладает трансферирующим действием и на соединения с α-1,6 связями.

Действие на крахмал. Реакционная смесь: 0,1 *мл* 2% растворимого крахмала при pH 3,5+0,1 *мл* фермента, реакция при 30° С. Хроматографический анализ продуктов производился через 3, 6, 12, 24 часа. Глюкоза обнаруживалась в ранние стадии гидролиза — до 12 часов, через 12—24 часа были соединения с Rf, близким к изомальтозам, т. е. фермент обладает гидролитической и трансферирующей активностью.

Действие трансглюкозидазы *Asp. niger* на крахмал было также установлено при использовании радиоактивного изотопа глюкозы, меченной по C^{14} (табл. 3).

Таблица 3

Радиоактивность изомальтозного участка бумажной хроматограммы при действии фермента трансглюкозидазы *Asp. niger* на меченную C^{14} глюкозу + + крахмал и глюкозу C^{14}

Время (в часах)	Глюкоза C^{14} и крахмал	Глюкоза C^{14}
	счет/мин	*счет/мин*
0	14	11
6	158	26
12	308	41
24	642	68

Из приведенных данных видно, что дисахарид изомальтоза в значительном количестве образовывался в опытной смеси путем перенесения глюкозных единиц крахмала к глюкозе. Как указывают авторы, трансглютизирующее действие полученный фермент может оказывать как при прямом воздействии на крахмал, так и при воздействии на олигосахариды, образуемые при его гидролизе.

Сравнительная характеристика амилолитических ферментов различных видов грибов, используемых в промышленности Японии, приводится в работе Оказаки [74, 75]. Автор разделяет изученные виды *Aspergillus* на ряд групп по характеру гидролиза крахмала:

1. В процессе гидролиза образуется меньше глюкозы, чем мальтозы — тип 1 (*Aspergillus oryzae*). Этот вид гриба образует α- и β-амилазы, но почти не активен в отношении трансглюкозидазы.

2. При гидролизе крахмала, наоборот, преобладает глюкоза — тип 2 (*Aspergillus usamii*). К данному типу относится и гидролиз, вызываемый некоторыми другими видами грибов — *Rhizopus topkinensis, Penicillium* sp., *Mucor* sp. Эти виды малоактивны в отношении α- и β-амилаз, но активны в отношении трансглюкозидазы.

3. В процессе гидролиза крахмала в первых фазах образуется много мальтозы, затем ее концентрация снижается — тип 3 (*Aspergillus awamorii*). Амилолитическая активность этого вида характеризуется тремя ферментами: α- и β-амилазами и трансглюкозидазой. В результате действия последней образуются неферментированные дрожжами олигосахариды (рис. 4).

Автор считает, что три фермента — α-амилаза, β-амилаза и мальтоолигосахарид трансглюкозидазы — являются наиболее важными компонентами грибных амилаз, ответственных за различные стороны процесса гидролиза крахмала.

Указанные виды грибов — продуцентов различных амилолитических ферментов могут использоваться при различных процессах гидролиза крахмала в практике.

Амилолитические свойства группы черных аспергиллов — *Asp. awamorii* при выращивании на отрубях и *Asp. usamii*

при глубинном выращивании на синтетической среде с сырым, заранее простерилизованным крахмалом,— изучал Уеда [87].

Из *Asp. awamorii* был получен препарат сахарогенной амилазы; инактивация декстриногенной амилазы в экстракте про-

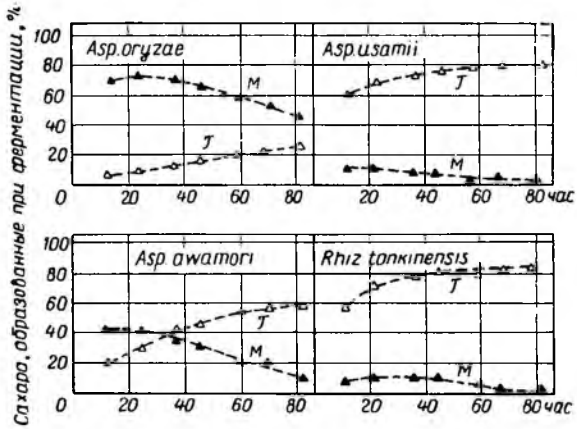


Рис. 4. Сравнительная характеристика амилолитических ферментов разных видов грибов по продуктам гидролиза крахмала (по Okazaki): *М* — мальтоза, *Г* — глюкоза.

изводилась подогреванием до 60° С в течение 15 *мин* при pH 2,4, а мальтозы — при подогревании до 60° при pH 7,8.

Из фильтрата 48-часовой культуры *Asp. usamii* на среде, содержащей 1% сырого крахмала, 0,2% мочевины, 0,1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02% NaCl, 0,2% KH_2PO_4, 0,1% глюкозы, при глубинном выращивании при pH 5,2 получен препарат декстриногенной амилазы.

Гидролиз сырого крахмала определяли в реакционной смеси, состоящей из 0,25 *г* сырого крахмала в 40 *мл* буфера pH 3,6; через установленные промежутки времени определяли редуцирующие сахара.

Автор считает, что изученные им виды из групп черных аспергиллов обладают сахарогенной амилазой с более высокой активностью гидролиза сырого крахмала, чем аспергиллы группы *Asp. oryzae.* Полученный автором фермент гидролизует сырой крахмал картофеля, кукурузы, риса при оптимальном pH 3,6. При совместном применении декстрогенной и сахарогенной амилаз степень гидролиза крахмала повышалась почти втрое по сравнению с их действием порознь. Применение амилаз этих видов грибов для гидролиза сырого крахмала избавляет от предварительного заваривания его и повышает выход спирта.

Характеристика комплекса амилолитических ферментов видов *Aspergillus* в связи с различными целями их применения приводится в работах ряда авторов [14, 15, 32, 33, 50, 51].

Родзевич [32, 33] считает, что анализ конечных продуктов гидролиза крахмала, декстринов и других полисахаридов ме-

тодом количественной хроматографии позволит установить особенности амилолитического комплекса отдельных видов и штаммов грибов и использовать эти данные при отборе продуцентов различных амилаз.

Характер компонентов амилаз может также регулироваться условиями культивирования видов грибов-продуцентов, способами выделения.

Смирнова, Фениксова [34, 35, 46, 47, 48 и 50] установили влияние состава среды на биосинтез и активность амилазы *Asp. oryzae*. Амилаза этого гриба образуется на синтетической среде с крахмалом, декстрином, мальтозой, но не с глюкозой, сахарозой, арабинозой, ксилозой, глицерином или маннитом. Из разных источников азота — аммонийного, нитратного, смеси аминокислот, пептона, нативного белка — наиболее активное образование амилазы было на среде Чапека с сернокислым аммонием. При этом, в зависимости от характера источника азота, направленность биосинтеза амилазы была различной. На среде Чапека с сернокислым аммонием (физиологически кислая соль) до 95,6% амилазы отмечалось в культуральной жидкости; на этой же среде с азотнокислым натрием (физиологически щелочная соль) при значительно более низкой активности биосинтеза фермента преобладающее количество амилазы (до 82,4%) содержалось в мицелии гриба (табл. 4).

Таблица 4

Рост и амилолитическая активность *Asp. oryzae* на синтетической среде с $(NH_4)_2SO_4$ или $NaNO_3$

Источник азота	Сухой вес мицелия, *г*	Амилолитическая активность, *ед*		
		на 100 *мл* среды	на 1 *г* сухого мицелия	Итого
0,15 % $N(NH_4)_2SO_4$.	1,79	76,4(95,6%)	5,3(4,4%)	81,7(100%)
0,15% N $NaNO_3$	1,11	7,8(17,6%)	36,8(82,4%)	44,2(100%)

При изменении начального pH среды добавлением фосфатного буфера можно изменить биосинтез амилазы и на среде с нитратным азотом — накопление фермента в культуральной жидкости в этих условиях достигает 85,4% (табл. 5).

Аналогичные данные получены и в отношении декстриназы на среде с сернокислым аммонием: до 77,6% фермента обнаружено в культуральной жидкости, в то время как на среде с нитратом было приблизительно равное количество фермента в мицелии и в культуральной жидкости. На биосинтез мальтазы характер источников азота не оказывает аналогичного

Таблица 5

Рост и амилолитическая активность *Asp. oryzae* на нитратной среде с фосфатным буфером (pH 6,3)

Среды	pH		Сухой вес мицелия, *г*	Амилолитическая активность, *ед*		
	первичная	конечная		на 100 *мл* среды	на 1 *г* сухого мицелия	Итого
С фосфатным буфером	6,2	6,2	1,26	71,7(85,4%)	12,3(14,6%)	84,0(100%)
С дистиллированной водой . .	6,7	7,2	1,21	9,3(23,1%)	30,9(76,9%)	40,2(100%)

влияния — до 75—76% ее обнаружено в культуральной жидкости.

При замене двузамещенного фосфорнокислого калия на однозамещенный выход амилазы в культуральную жидкость *Asp. oryzae* также значительно увеличивается (до 67%), а при культивировании на среде с K_2HPO_4 амилаза не выделяется в культуральную жидкость [34].

Важное значение для активности образования определенных амилолитических ферментов у грибов имеют не только условия культивирования, но и способ выращивания культур и посевного материала, а также применение высокоактивных штаммов-продуцентов.

Активные варианты из музейных и производственных культур *Asp. oryzae* получили Татаренко и сотрудники [38] путем УФ облучения конидий 7—12-дневных культур, гибридизации разных штаммов при культивировании их на полноценных и обедненных синтетических и природных средах и другими методами. Под воздействием УФ облучения активный складчатый вариант для глубинного культивирования был получен Двадцатовой [15] из *Asp. oryzae* 153.

Наиболее активный выход амилазы у селекционированного штамма *Asp. oryzae* отмечался при глубинном культивировании на среде Чапека с 10% водного экстракта из солодовых ростков. При этом оказалось, что смесь метионина, треонина и серина оказывала аналогичный стимулирующий эффект [14, 16, 51, 53, 56] (табл. 6).

Штейнер [82], изучая влияние микроэлементов Zn, Fe, Cu, Mn, Mg на рост *Asp. oryzae* и образование амилолитических и протеолитических ферментов, установил, что при недостатке Cu или снижении содержания в среде Cu и Zn усиливается активность образования амилазы, а для образования протеолитических ферментов необходимо наличие Fe, Zn в концентрации, оптимальной для. роста мицелия гриба. Повышение активности биосинтеза протеаз происходит при недостатке в

Таблица 6

Образование амилазы в глубинной культуре *Asp. oryzae* 3—9—15, выращенной на среде Чапека с нитратом натрия и водным экстрактом из солодовых растворов

Номер опыта	Среда Чапека с нитратом натрия	pH среды	Биомасса гриба, *г* сухого мицелия на 100 *мл* среды	Активность амилазы, *ед* АС	
				на 100 *мл* среды	на 1 *г* сухого мицелия
1	С водным экстрактом из солодовых ростков	8,8	1,31	360,0	Следы
2	То же	8,7	1,22	360,0	10,0
3	» »	8,8	1,24	300,0	8,4
4	» »	8,6	1,39	360,0	6,8
1	Без водного экстракта из солодовых ростков	7,7	0,81	10,0	44,0
2	То же	7,9	0,81	20,0	40,1
3	» »	7,9	0,88	10,0	35,0
4	» »	7,9	1,11	10,0	40,0

среде Mg и Cu и избытке Fe. Протеолитическая и амилолитическая активность гриба под влиянием микроэлементов зависит от источника углерода. Так, в присутствии всех микроэлементов лучшим источником углерода для синтеза декстриногенной амилазы, по данным автора, является мальтоза, при отсутствии их в среде — декстрины. Недостаток меди при всех источниках углерода (крахмал, декстрины, мальтоза, глюкоза) вызывает повышение биосинтеза амилазы. Лучшими источниками азота для образования декстриногенной амилазы являются сернокислый и фосфорнокислый аммоний.

Вяткин [8] отмечает влияние Mg на амилолитическую активность *Asp. niger.*

Стимулирующее действие K_2HPO_4, $NaNO_3$, NaF на амилолитическую активность *Asp. oryzae* установили Малков и Деева [23—25]. Авторы не отмечали прямой связи между влиянием испытанных соединений на рост биомассы гриба и его амилолитической активностью. Незначительное торможение дыхания мицелия под влиянием низких концентраций $NaNO_3$, NaF, по их данным, повышает активность амилазы *Asp. oryzae.*

В опытах Томомура и сотр. [84—86], изучавших влияние разнообразных веществ — моно-, ди- и трисахаридов, гликозидов, фосфорных эфиров сахаров и отдельных полисахаридов — на образование α-амилазы *Asp. oryzae* 557, биосинтез фермента отмытыми клетками мицелия наблюдался при внесении в реакционную смесь ($^1/_{30}$ М фосфатный буфер, pH 5,8) в концентрации 0,05% изомальтозы, панозы, амилозы, колибиозы. Глюкоза, глюконовая кислота, глицерин и рибоза ингибирова-

ли образование α-амилазы. В опытах с меченной по углероду мальтозой установлено, что последняя превращается трансглюкозидазой гриба в изомальтозу.

Торможение биосинтеза амилазы *Asp. oryzae* изучалось Тихомировой [41].

Андеркофлер и Рой [88] получили из культуральной жидкости *Asp. oryzae* при глубинном культивировании гриба на минеральной среде с крахмалом кристаллические препараты, обладающие высокой альфа-амилазной и декстриназной активностью.

Путем многократного осаждения из концентрированного раствора сульфатом аммония и адсорбцией на бентоните получен в кристаллическом виде препарат, обладающий высокой (до 1600 *ед/мл*) α-амилолитической активностью (рис. 5, *а*). При обработке концентрированного раствора фермента, полученного после трехкратного высаливания сульфатом аммония, хлористой ртутью, с целью инактивации α-амилазы, и последующим осаждением сульфатом аммония, хлористым натрием, получен в кристаллическом виде препарат, обладающий высокой декстриназной активностью, но почти не обладающий α-амилазной активностью (рис. 5, *б*). Авторы отмечают, что особенно на последних этапах получения кристаллических препаратов наблюдается значительная инактивация ферментов.

При кристаллизации, как указывают, например, Фишер и Моклюллин [67, 68], может происходить значительная потеря активности, хотя контрольное изучение препарата и показывает его гомогенность. Авторы предполагают, что в этих случаях, по-видимому, денатурированный фермент во время очистки образует осадок, обладающий аналогичными физико-химическими свойствами с нативным ферментом. Из очищенного ими препарата α-амилазы *Asp. oryzae* кристаллическая α-амилаза была получена только при последовательном фракционированном осаждении растворами сульфата аммония предварительно насыщенным NaCl. Путем создания таким образом большой ионной силы раствора авторам удалось при первом осаждении удалить бо́льшую часть примеси, значительно увеличить активность раствора, из которого могла кристаллизоваться α-амилаза. (Единица активности равняется количеству фермента, освобождающего 1 *мг* мальтозы за 3 *мин* при 20° С и pH 5,7. Степень чистоты — отношение активности к азоту в *мг*). Ниже (табл. 7) приведены основные стадии очистки α-амилазы для последующей кристаллизации.

Осадок, полученный в V стадии очистки, центрифугировали при 40 000 *об/мин*, затем растворяли в минимальном количестве воды и концентрировали на селикагеле. Через 24—48 *час* на холоде из него выпадает до 70—80% кристаллической амилазы (в растворе), которая при электрофоретическом изуче-

Таблица 7

Перечень процедур при очистке α-амилазы *Asp. oryzae*

Номер процедур	Наименование процедур	Выход по отношению к начальному, %	Степень очистки, *А/мгN*	Обогащение по отношению к неочищенному раствору
	Исходный раствор	—	625	—
I	Раствор после центрифугирования (3000 *об/мин*, 0° С) .	90	915	1,46
II	Сульфат аммония 0,8 насыщения	68	1100	1,76
III	Ацетон 40—58%	52	1200	1,92
IV	NaCl + сульфат аммония 0,54—0,72 насыщения . .	41	1630	2,6
V	NaCl + сульфат аммония 0,41—0,71 насыщения . .	25	1950	3,1

нии является гомогенной. Препарат проверен также на отсутствие мальтазы. Кристаллы выдерживали в 1%-ном растворе мальтозы на протяжении 12 *час* при 20° С и pH 4,7. При этом продуктов ее гидролиза не обнаружено. Из 60 *г* неочищенного препарата авторами было получено около 800 *мг* кристаллической α-амилазы. Изучены ее свойства — активность и стабильность при разном pH, спектр поглощения, отношение к температуре, энергия инактивации и др.

Тсиджисака, Фукомото, Ямамото [86а] из *Rhizopus delemar* и *Asp. niger* получили кристаллическую сахарогенную амилазу.

Как отмечает также ряд японских авторов, при очистке, особенно на этапах, предшествующих кристаллизации, могут изменяться свойства фермента вследствие денатурации белка. Поэтому такие исследования требуют соблюдения ряда условий: работу необходимо проводить на холоду, растворы соли для осаждения добавлять осторожно и постепенно [61, 63, 64].

Кристаллическая амилаза из культуры *Asp. oryzae* (при культивировании на отрубях), обладающая активностью в 6600 *ед* АС/*г* сухого препарата по сравнению с исходной активностью 40—45 *ед* АС/*г*, была получена Фениксовой [53], Молодовой [26]. Автор отмечает, что при очистке препарата из культуры гриба на отрубях значительным препятствием являются пигменты и другие примеси. После обработки диализированного раствора фермента средним уксуснокислым свинцом раствор удавалось значительно осветлить.

Методы изоляции ферментов, их разделения, очистки и кристаллизации находятся в определенной зависимости от условий культивирования гриба-продуцента, комплекса образуемых им ферментов как при поверхностном, так и при глубинном выращивании.

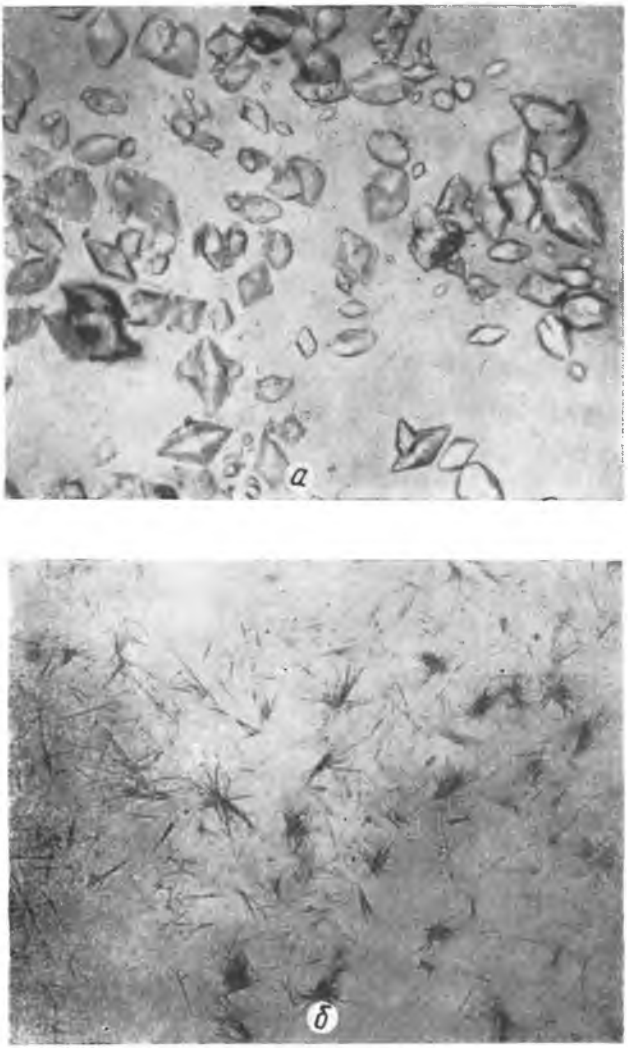


Рис. 5. Кристаллические ферменты (по Underkofler): *а* — амилаза, *б* — декстриназа (150×).

Применяя различные концентрации этанола, Орещенко [28, 29] разделила комплекс амилолитических и протеолитических ферментов культуры *Asp. oryzae* на пшеничных отрубях. Максимальная активность протеазы (95%) с незначительной примесью амилазы (до 15%) была обнаружена при концентрации этанола 45—59°; максимальная активность амилазы (около 90%) выявлена при концентрации спирта 70—77° (рис. 6). Оптимальное для фракционного разделения ферментных комплексов pH 5,1; разделение производилось на холоду (0° С).

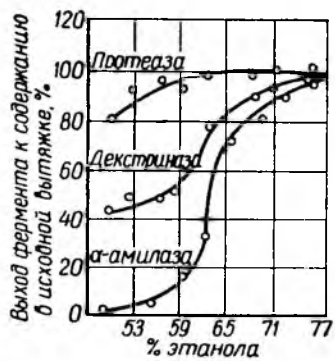


Рис. 6. Фракционированное разделение ферментов *Aspergillus oryzae* из водной вытяжки культуры на отрубях (по Орещенко).

Шульман [58, 59], изучавший влияние концентрации различных растворителей на полноту осаждения ферментов из водной вытяжки культуры *Asp. oryzae* на отрубях, указывает, что полнота осаждения зависит от изменения полярности раствора, величины диэлектрической постоянной. Полное осаждение ферментов отмечено в таких концентрациях: этанола — 70%; изопропанола — 50%, смеси этанола и бутанола (1 : 0,8) — 59—60%; смеси этанола и изоамилового спирта (1 : 0,4) — 60%, смеси этанола и серного эфира (1 : : 0,6) — 60%; ацетона — 62—60%. Авторы рекомендуют для улучшения осаждения добавлять в раствор электролиты, в частности хлористый кальций (0,25—0,3%).

Степанищев [36] для увеличения скорости диализа водных вытяжек из культуры *Asp. oryzae* на отрубях, которые содержат различные примеси, предложил использовать электродиализ.

Применение грибных амилаз. Грибные амилазы широко применяются в практике. Как уже упоминалось, наиболее давним является использование амилазы из *Asp. oryzae* в Японии. В этом случае ферменты гриба, выращенного на зерне или чаще отрубях, использовались для гидролиза крахмала в различных пищевых производствах, при приготовлении соусов, напитков и т. п.

Наиболее широко и эффективно амилаза применяется в бродильной промышленности — пивоваренной, спиртовой, хлебопекарской и при получении глюкозы ферментативным гидролизом крахмала.

В зависимости от цели использования в производстве меняется состав, степень очистки, способы применения амилаз.

В бродильной промышленности весьма экономически эффективна замена зернового солода на амилазы грибов — «грибной» солод. Амилазы применяются при процессах брожения заторов с целью гидролиза крахмального сырья и создания благоприятных условий для роста и использования образуемых сахаров соответствующими расами дрожжей. Для пивоварения имеет значение комплекс амилаз, разжижающих и осахаривающих крахмал. Однако считают, что некоторое количество декстринов, образующихся под действием амилаз, несброженных дрожжами и не разрушенных действием декстриназ, является желательным в пиве. Они придают пиву своеобразный вкус, пенистость. Эффективно также применение амилазы в пивоварении при использовании неосоложенного сырья, крахмал которого под воздействием фермента быстро гидролизуется.

По данным Токаревой [42—44], амилазы из глубинной культуры *Asp. oryzae*, свободные от протеазы, и из *Asp. awamorii* (0,02—0,05%) при изготовлении ржаного хлеба сокращают время брожения, усиливают размножение дрожжей, газообразование и подъемную силу их, усиливают размножение молочнокислых бактерий. В хлебе при этом обнаруживаются продукты ферментативного гидролиза — сахара́ (глюкоза, ксилоза, арабиноза), а также треонин и другие вещества.

Для спиртовой промышленности более желателен полный гидролиз крахмала до глюкозы, что обеспечивает лучший рост дрожжей и более высокую активность образования спирта.

В хлебопекарской промышленности в зависимости от характера производимого изделия и качества сырья также неодинаковы требования к различным амилазам. Так, при изготовлении особых сортов сладкого заварного хлеба используются амилазы с высокой осахаривающей и мальтазной активностью. Об успешном применении концентрированных препаратов из *Asp. oryzae* (амилазы) и *Asp. awamorii* (амилазы, декстриназа, мальтаза) сообщают Токарева и Кретович [43]. Добавление 0,002% препарата (к весу муки) в опару или 0,007% в заварку для жирных дрожжей, а при ржаной муке — 0,05% значительно улучшало качество хлеба — вкус, аромат, объем, пористость, повышало содержание сахаров и аминного азота. Сравнительную характеристику мальтазной активности очищенных и неочищенных препаратов амилазы разных видов *Aspergillus* с целью применения в хлебопечении привели Ведерникова, Люшинская и др. [67] (рис. 7). По данным авторов, при фракционированной очистке отмечается потеря мальтазной активности. Наиболее активным при испытании неочищенных препаратов оказался штамм *Asp. niger* (63,3% гидролиза мальтозы), а очищенных — *Asp. niger* (60,8%) и *Asp. awamorii* (65,2%).

В хлебопекарской промышленности имеет также значение применение определенной специфической амилазы. Как видно из сообщения Локвуда [22], наиболее эффективной является декстриногенная термолабильная α-амилаза. Это объясняется тем, что в муке имеется только β-амилаза, поэтому добавление декстриногенной амилазы создает весьма благоприятные условия для повышения активности β-амилазы. Наиболее пригодна, по мнению автора, для целей хлебопечения термолабильная грибная амилаза (рис. 8), так как ее действие прекращает-

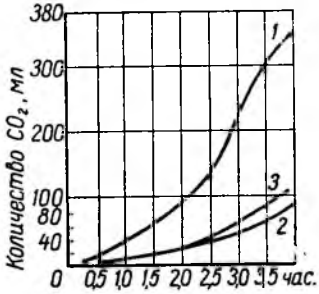


Рис. 7. Сравнительная активность мальтазы неочищенных ферментных препаратов из *Aspergillus oryzae* (*1*), ячменного солода (*2*) и хлебопекарских дрожжей (*3*) (по Ведерниковой и др.).

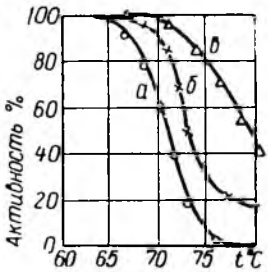


Рис. 8. Термическая устойчивость амилаз различного происхождения (по Локвуду):
а — грибная; *б* — зерновая; *в* — бактериальная.

ся при начале выпечки хлеба. Амилаза из зернового солода не всегда эффективна вследствие примеси протеазы, большое количество которой отрицательно влияет на качество хлеба. Применяемый специально селекционированный штамм *Asp. oryzae* при глубинном методе культивирования отличается незначительной активностью образования мальтазы, протеазы в культуральной жидкости.

Сравнительно новой областью применения амилаз является получение путем ферментативного гидролиза крахмала кристаллической глюкозы, глюкозной и мальтозной патоки. С этой целью применяют глюкоамилазу, образуемую видами *Rhizopus* (*Rh. delemar, Rh. niveus, Rh. tonnensis, Rh. japonicum*), а также *Asp. usamii, Asp. awamorii, Asp. niger* и некоторыми штаммами других видов. Эффективно совместное применение термостабильной бактериальной амилазы и глюкоамилазы *Rh. delemar* или другого вида гриба. Первый фермент используется при начальных стадиях гидролиза крахмала, а второй — после его инактивации нагреванием. В этих случаях достигается гидролиз крахмала до глюкозы более чем на 90%. При получении

глюкозной или мальтозной патоки также применяют амилазы с различными амилолитическими свойствами.

Амилазы могут использоваться также в текстильной промышленности для расшлихтовки тканей. Шлихтование основы производится различными клеящими веществами для придания прочности, гладкости и эластичности. В качестве материала для шлихты применяются клейстеры из различных крахмалов. Но перед покраской и для отбелки шлихта должна быть удалена из ткани. Снятие ее амилолитическими ферментными препаратами происходит полно, относительно быстро и не ухудшает качества ткани.

Александров и Якимов [1] получили неочищенный препарат амилазы из мицелия *Pen. chrysogenum* и разработали способ его применения для расшлихтовки ткани. Они установили, что при поверхностном выращивании в мицелии *Pen. chrysogenum* содержатся α- и β-амилазы, а при глубинном — α-амилаза. Конечными продуктами гидролиза крахмала при pH 6,7—6,8 являются мальтоза, «конечный» декстрин и следы глюкозы.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что использование различных амилолитических ферментов зависит от области их практического применения в определенных отраслях пищевой промышленности. Следует отметить, что при переходе к применению очищенных индивидуальных или компонентных препаратов амилаз дополнительно возникает необходимость выяснения ряда вопросов, связанных с их активностью. Эти вопросы в настоящее время усиленно изучаются.

Амилазы для практического применения получаются путем выращивания грибов-продуцентов поверхностным способом на отрубях. Это наиболее старый и относительно примитивный способ.

Гриб выращивают на увлажненных до 50—60% отрубях (лучше пшеничных, pH 3,5), расположенных тонким слоем в специальных кюветах. При этом поддерживается соответствующая температура (30—32° С) и аэрация. Рост гриба продолжается 1,5—2 суток, после чего проросшую грибом массу отрубей из кювета перекладывают в сушилку. Для осахаривания заторов применяют 4—6% этого материала; при активной культуре процесс осахаривания протекает в течение нескольких часов [18, 19, 49, 54, 55, 56].

Наряду с использованием культур грибов на отрубях можно получать концентрированные, неочищенные амилазы путем их экстракции водой при соответствующих pH с последующим осаждением ацетоном или этиловым спиртом.

Взамен грибных культур на отрубях разрабатываются способы поверхностного и глубинного выращивания грибов-продуцентов для получения концетрированных и очищенных препаратов амилаз.

При глубинном методе выращивания селекционированные штаммы грибов-продуцентов амилазы первоначально выращивают в жидких средах в колбах Эрленмейера на круговых качалках, затем в малых ферментерах и, наконец, в производственных ферментерах с полезной емкостью до 20 $м^3$ и более. На всех этапах выращивания культуры проверяется стерильность и амилолитическая активность культуральной жидкости.

Большей частью применяются синтетические среды с различными компонентами углеродного, витаминного и азотного питания и среды неопределенного состава с учетом их экономической рентабельности и наличия отдельных видов местного сырья. В зависимости от условий культивирования срок ферментации различен. По окончании процесса культуральную жидкость, в которой находится основная масса фермента, отделяют от мицелия гриба и подвергают дальнейшей обработке с целью получения концентрата фермента.

В ряде описанных методов культуральная жидкость концентрируется упариванием под вакуумом и при температуре, не инактивирующей амилазы до определенного объема, после чего фермент осаждается из концентрата путем осторожного прибавления ацетона на холоду. Осадок представляет концентрированный неочищенный препарат амилазы и в таком виде может использоваться в практике. При надобности может быть произведена дальнейшая его очистка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров А., Якимов П. Использование ферментной активности отработанной пленки *Pen. chrysogenum* в текстильной промышленности.— Тр. ленингр. хим.-фарм. ин-та, 1960, **9**, 220.

2. Афанасьев П. Определение активности ферментов.— Внедрение ферм. преп. (сб. докл. на Всесоюзн. конфер.), Ч. II. Цинтипищепром, М., 1961.

3. Бригаденко М. Частичная замена солода поверхностной культурой плесневого гриба.— Спирт. пром., 1961, **1**, 19.

4. Бродская С. Влияние различных доз УФ излучения на получение вариантов *Asp. nidulans*, образующих активные протеазы.— Микробиология, 1960, **29**, 358.

5. Бродская С. Получение под действием ультрафиолетовых лучей вариантов аспергиллов, образующих активные протеазы.— сб.: Внедр. ферм. пер. Ч. I, 1961.

6. Ведерникова Е. и др. Мальтазная активность ферментных препаратов плесневых грибов, предназначенных для хлебопекарного производства.— Микробиология, 1962, **31**, 1087.

6а. Вийнарский И. Стандартизация и стабилизация промышленных препаратов ферментов.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим., 1964.

7. Вилан В. Крахмал, гликоген и другие сходные с ними полисахариды.— В кн.: Биохим. методы анализа растений. Под ред. М. Запрометова, ИЛ, М., 1960

8. Вяткин В. Влияние солей магния на ферментативную активность глубинной культуры *Aspergillus niger*.— Тр. Ин-та микробиол. АН СССР, 1959, 6, 150.

9. Вяткин В. Применение культуры плесневых грибов при производстве спирта.— Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). Ч. II. Цинтипищепром, М., 1961.

10. Гендина С. Повышение ферментативной активности культур грибов путем селекции.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. 1964.

11. Гребешова Р. Содержание фосфорных соединений в мицелии мутанта *Aspergillus niger*, полученного под влиянием ультрафиолетовых лучей.— Микробиология, 1962, **31**, 424.

12. Даниляк Н., Черевко Н. О влиянии активной кислотности среды на амилолитические ферменты гриба.— Спирт. пром., 1963, 7, 11.

13. Даниляк Н., Черевко Н., Кленикова Р. Устойчивость амилолитических ферментов при хранении препарата.— Спирт. пром., 1962, 8, 11.

14. Двадцатова Е. Влияние источников азота на образование амилазы глубинными культурами *Aspergillus oryzae*, 153, *Aspergillus oryzae* 3—9—15.— Тр. Центр. н.-и. ин-та спирт. и ликеро-вод. пром., М., 1960, 9, 7.

15. Двадцатова Е. Получение активного по амилазе гриба *Aspergillus oryzae* 3—9—15 для глубинного культивирования. Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). Ч. I. Цинтипищепром, М., 1961, 37.

16. Двадцатова Е. Влияние состава питательной среды на образование амилазы в глубинных культурах плесневых грибов.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим., Л., 1964.

16а. Иерусалимский Н. Метод непрерывного культивирования микроорганизмов и его значение для бродильной промышленности.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

17. Имшенецкий А., Перова К. Амилолитическая активность складчатых рас *Aspergillus niger*.— Микробиология, 1953, **22**, 2, 133.

17а. Имшенецкий А. А. Теоретические основы селекции полезных микроорганизмов.— Тр. Ин-та микробиол. АН СССР, 1961, **10**, 5.

18. Калашников Е. Биохимические и физиологические особенности гриба *Aspergillus oryzae*, влияние условий на его культивирование в производстве, на образование амилолитических и протеолитических ферментов.— Тр. ин-та микробиол. АН СССР, 1959, **6**, 132.

19. Калашников Е. Основы технологии культивирования плесневых грибов в производстве ферментных препаратов.— Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). Ч. II. 1961, 3.

20. Котов В. Получение активных вариантов плесневых грибов.— Тр. Центр. н.-и. ин-та спирт. и ликеро-вод., пром., 1961, **11**, 146.

21. Кузюрина Л. Получение мутантов у *Aspergillus niger* 6/5. Однократное действие ультрафиолетовых лучей.— Микробиология, 1961, **30**, 897.

22. Локвуд А. Производство грибной амилазы и ее применение в хлебопечении.— Симпоз. по производству и применению ферм. преп. пищевой пром. Пер. и ред. Р. Фениксовой. Пищепромиздат, М., 1963.

23. Малков А., Деева В. Влияние ортофосфата на амилолитическую активность гриба *Aspergillus oryzae*.— Изв. высш. учеб. завед. Пищев. технол. 1960, 5, 68.

24. Малков А. Частичное торможение дыхания гриба *Aspergillus oryzae* как путь усиления его амилолитической активности.— Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. Всесоюз. конфер.). Ч. I, М., 1961.

25. Малков А., Деева В. Влияние частичного торможения дыхания гриба *Aspergillus oryzae* на синтез биомассы, содержание P_7 и амилолитическую активность.— Микробиология, 1961, **30**, 229.

26. Молодова Г. Получение кристаллической α-амилазы *Aspergillus oryzae*.— В кн.: Внедрение ферм. преп. Ч. I. М., 1961, 73.

27. Оказаки Х. (H. Okazaki). Биохимические основы производства ферментных препаратов.— Тр. V Биохим. конгр. VIII симпоз. Биохим. основы технол. пищевых производств. М., 1962, 306.

28. Орещенко Л. Разделение амилолитических и протеолитических ферментов плесневых грибов.— Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). Ч. I, Цинтипищепром., М., 1961, 108.

29. Орещенко Л.— Разделение и очистка амилаз и протеиназ плесневых грибов.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим., Л., 1964.

29а. Писаренко Н.— Особенности получения ферментов в кристаллическом состоянии.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

30. Пронин С. Амилолитические ферменты и их роль в пищевой промышленности. Гизлегпищепром, М., 1953.

31. Рашба О., Зайченко О. Исследование амилазной и сахаразной активности мицелиальных отходов при производстве пенициллина и стрептомицина.— Мікробіол. ж. АН УРСР. 1962, **24**, 6, 32.

32. Родзевич В., Каллер Н., Добролинская Г. Амилолитический комплекс ферментов плесневых грибов.— В кн. Внедрение ферм. преп. (Сб. докл на Всесоюз. конфер.). Ч. I. Цинтипищепром, М., 1961, 99.

33. Родзевич В., Добролинская Г., Шилова А. Карбогидразы аспергиллов.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

34. Смирнова Л. Влияние фосфорно-кислых солей на активность и содержание в мицелии амилолитических ферментов у *Aspergillus oryzae*.— Микробиология, 1956, **25**, 584.

35. Смирнова Л. Влияние окисленной и восстановленной формы азота в среде на выделение амилазы из мицелия *Aspergillus oryzae*.— Микробиология, 1956, **25**, 423.

36. Степанищев К. Очистка ферментных растворов методом диализа и электродиализа.— Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). Ч. I. М., Цинтипищепром, 1961, 126.

37. Степаненко Б. Новые данные о химическом строении полисахаридов крахмала.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

38. Татаренко Е. и др.— Экспериментальное получение более активных форм плесневых грибов. Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). Ч. II. Цинтипищепром, М., 1961, 29.

39. Тихомирова А. Адаптивность амилолитических ферментов *Asperillus oryzae*.— Микробиология, 1959, **29**, 45.

40. Тихомирова А. Индуцированный синтез амилазы мицелием *Aspergillus niger*.— Микробиология, 1960, **29**, 90.

41. Тихомирова А. Ингибирование глюкозой индуцированного синтеза амилазы *Aspergillus oryzae*.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964. Микробиология, 1964, **33**, 7.

42. Токарева Р. Применение ферментных препаратов плесневых грибов в хлебопекарской промышленности.— В кн.: Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). Ч. II. Цинтипищепром, М., 1961.

43. Токарева Р., Кретович В. Применение концентрированных ферментных препаратов из плесневых грибов в хлебопечении.— Тр. V Междунар. биохим. конгр. VIII симпоз. М., 1962.

44. Токарева и др. Применение ферментных препаратов для улучшения качества хлеба из пшеничной муки пониженного качества.— Тр. Центр. н.-и. ин-та хлебопек. пром., 1962, 10, 138.

45. Трайнина Т., Лифшиц Д., Калашников М. Влияние качества пшеничных отрубей на амилолитическую активность ферментных препаратов.— Микробиология. 1961, **30**, 540.

46. Фениксова Р. Плесневые грибы из *Aspergillus oryzae* как продуценты амилазы.— Микробиология, 1953. 22, 145; Там же, 28.

47. Фениксова Р., Сегаль Р. Плесневые грибы из р. *Aspergillus* как продуценты амилазы. III. Влияние условий выращивания гриба *Aspergillus oryzae*.— Микробиология, 1953, 22, 543.

48. Фениксова Р. Физиология питания *Aspergillus oryzae* и образование активной амилазы грибом.— Proc.Int. Symp. Chem. Tokyo—Kyoto, 1957.

49. Фениксова Р. Препараты ферментов, применяемые в пищевой промышленности. Цинтипищепром, М., 1958, 55.

50. Фениксова Р., Двадцатова Е. Амилолитическая активность *Aspergillus oryzae* на искусственных средах.— Тр. Ин-та микробиол. АН СССР, 1959, 6.

51. Феникcова Р., Двадцатова Е. Подбор питательной среды, обеспечивающей максимальное образование амилолитических ферментов.— Тр. Центр. н.-и. ин-та спирт. и ликеро-вод. пром., 1960, 9, 3.

52. Феникcова Р., Молодова Г. Получение очищенных препаратов ферментов из поверхностных культур плесневых грибов.— Микробиология, 1961, 30, 534.

53. Феникcова Р., Молодова Г. Получение кристаллической α-амилазы *Aspergillus oryzae*.— Микробиология, 1961, 30, 607.

54. Феникcова Р. Технология производства концентрированных препаратов ферментов.— Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). Ч. 1. Цинтипищепром, М., 1961.

55. Феникcова Р. Применение поверхностной культуры гриба взамен солода при производстве спирта.— Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). Ч. II. Цинтипищепром, М., 1961.

56. Феникcова Р. Биохимические основы производства ферментных препаратов микробного происхождения.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

56а. Циперович А. Ферменты в промышленности. Гостехиздат, К., 1962.

56б. Цеперович А. О некоторых принципах технологии ферментов.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим., Л., 1964.

57. Шаройко К. Производство мальтазной патоки с использованием гриба *Aspergillus oryzae*.— Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). Ч. II. Цинтипищепром, М., 1961.

58. Шульман М. Влияние химической природы жидкостей на осаждение ферментного комплекса *Aspergillus oryzae*.— Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). Ч. II. Цинтипищепром, М., 1961.

59. Шульман М. Использование сорбции с целью очистки и концентрирования разбавленных растворов амилолитических ферментов.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

59а. Юркевич В. Значение голодания клеток для индукции ферментов.— ДАН СССР, 1964, 154, 473.

59б. Якобсон В. Исследования в области технической микробиологии.— В кн.: Микроорганизмы и среда. Изд-во АН Латв. ССР, 1962, 89.

60. Яровенко В. Ферментативный гидролиз крахмала при непрерывном спиртовом брожении.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

61. Akabori S. et al. An attempt to study the mechanism of amylase action by the use of C^{14} labeled starch.— J. Gen. Appl. Microbiol., 1955, 1, 1.

62. Burger M., Beran K. On the mechanism of action of maltase of the mould *Aspergillus niger*. I. The effect of temperature on the activation on starch hydrolysis by mould preparations.— В кн.: Сб. чех. хим. работ, 1957, 22, 291.

63. Davies R. Microbial extarcellular enzymes, their uses and factors affecting their formation.— Biochem. Ind. Microorganisms. Ed. Reibow C., Rose A., 1963, 68.

64. Dunn C. et al. Production of amylolytic enzymes in natural and synthetic media.— Appl. Microbiol., 1959, 7, 212.

65. Erb N. M., Wisthoff R. T., Jacobs W. L. Factors affecting the production of amylase by *Aspergillus niger*, strain N RRL 337, when grown in submerged culture.— J. Bacteriol., 1948, 55, 813.

66. Fields M., Ammerman G., Destrosier N. Effect of irradiation on growth and enzyme activity of *Aspergillus oryzae* — Appl. Microbiol., 1961, 9, 10.

67. Fischer E. et Montmallin R. Purification et crystallisation de l'α-amylase d'*Aspergillus oryzae*.— Helv. Chim. Acta, 1951, 34, 6, 1987.

68. Fischer E. et Montmallin R. Properties de l'α-amylase d'*Aspergillus oryzae* crystalliseé.— Helv. Chim. Acta, 1951, 6, 1994.

69. French D. Action mechanism of β-amylase.— Proc. Int. Symp., Tokyo, Jova, 1957, 530.

70. Hopkins R. N. The action of the amylases.— Adv. Enzymology, 1946, **6**, 389.
71. Kujawski M., Piller K. Badania nad otrzymywaniem plesniowych preparatów enzymatycznych-amylolitycznych. III. Proby zastosowania wyslodzin browarnianych (mlota) do produkcji plesniowych preparatow amylolitycznych.— Acta microbiol. Polon., 1960, **9**, 289.
72. Игути Ивао, Иосидзава Се. Изучение аспергиллов. VI. Стабилизация активности образования амилазы.— РБЖ, 1963, 18Б196. (Ann. Rept. Takamine Lab., 1962, **14**, 115).
73. Нэхира, Номи. Таксономическое изучение рода *Aspergillus* III. Соотношение между морфологическими и амилолитическими свойствами. IV. Соотношение между морфологическими и протеолитическими свойствами.— РБЖ, 1958. 2, 5145.— (J. Ferm. Technol., 1956, **34**, 391; **27**, 457).
74. Okazaki H. Joint action of a dextrinogenic amylase, a glucose-producing amylaze and transglucosidase upon starch in the presence or absence of yeast.— Arch. Biochem. Biophys., 1956, **63**, 322.
75. Okazaki H. Mould amylase system.— Proc. Int. Symp. on Enzyme Chem., Tokyo—Kyoto, 1957, 494.
76. Pazur J., French D. The action of transglucosidase of *Aspergillus oryzae* on maltose.— J. Biol. Chem., 1952, **196**, 1, 265.
77. Pazur J., Ando T. The hydrolysis of α-D-glucosides by *Aspergillus niger*.— J. Biol. Chem., 1959, **234**, 1966.
78. Pazur J., Ando T. The action of an amyloglucosidase of *Aspergillus niger* on starch and maltooligosaccharides.— J. Biol. Chem., 1960, **235**, 297.
79. Pazur J., Ando T. The hydrolysis of glucosyl oligosaccharides with α-D-(1—4) and α-D-(1—6) bonds by fungal amyloglucosidase.— J. Biol. Chem., 1960, **235**, 297.
80. Pazur J., Ando T. The isolation and the mode of action of fungal transglucosidase.— Arch. Biochem. et Biophys., 1961, **93**, 43.
81. Pazur J., Kleppe K. The hydrolysis of α-D-glucosides by amyloglucosidase from *Aspergillus niger*.— J. Biol. Chem., 1962, **237**, 1002.
82. Steiner K. Übed en Einfluβ von spurenelementen auf Wachstum und Enzymbildung von *Aspergillus oryzae*.— Zbl. Bacteriol., Abt. 2, 1961, **114**, 47.
83. Thoma J., Koshland D. Stereochemistry of enzyme, substrate and products during β-amylase activity.— J. Biol. Chem., 1960, **235**, 2511.
84. Tomomura K., Sudzuki H. The effect of analogues of amino acids on α-amylase formation in *Aspergillus oryzae*.— Rept. Ferm. Res. Inst., 1958, **16**, 53.
85. Tomomura K., Sudzuki H. On the inducers of α-amylase formation in *Aspergillus oryzae*.— Rept. Ferm. Inst., 1958, **16**, 41.
86. Tomomura K. et al. On the inducers of α-amylase formation in *Aspergillus oryzae*.— Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 1961, **25**, 1.
86a. Tsujisaka I., Fukumoto J., Yamamoto T. Specificity of crystalline saccharogenic amylase of moulds.— Nature (Ind), 1958, **181**, 770.
87. Ueda S. Bleak koji mould amylase system responsible for digesting raw starch.— Proc. Int. Symp. on Enzyme Chem. Tokyo—Kyoto, 1957, 491.
88. Underkofler L., Roy D. Crystallization of fungal alpha-amylase and limit dextrinase.— Cereal Chem., 1951, **28**, 18.
89. Wolf M. J., Jurkovich V., MacMasters M. Fractionation of a crude polysaccharase system by preparative paper chromatography and paper electrophoresis.— Arch. Biochem. Biophys., 1959, **81**, 15.

ЦЕЛЛЮЛАЗЫ И ГЕММИЦЕЛЛЮЛАЗЫ

Целлюлазы — ферменты, гидролизующие целлюлозу (клетчатку). Высшие растения на протяжении вегетационного периода синтезируют миллионы тонн клетчатки: она составляет

20—80% органического вещества растений. Из усвоенного зелеными растениями углерода атмосферы до половины используется на синтез целлюлозы.

Целлюлоза представляет собой наиболее распространенное в природе органическое соединение. Она является главной составной частью оболочек клеток высших растений, травянистых и древесных. В большом количестве целлюлоза собирается с урожаем различных растений в виде хлопка, льна, конопли и других прядильных культур, соломы, оболочек семян, плодов и т. д. Значительная часть синтезированной растениями целлюлозы попадает с растительными остатками в почву, водоемы, навоз и т. д.

В то время как синтез клетчатки осуществляется почти исключительно зелеными растениями, ее распад в процессе круговорота веществ в природе совершается в основном различными микроорганизмами. Как теперь известно, даже жвачные животные, употребляющие значительное количество целлюлозосодержащих кормов, не синтезируют фермента целлюлазы, и разложение клетчатки в рубце происходит под воздействием различных обитающих в нем микроорганизмов.

Изучение ферментативных комплексов и путей разложения целлюлозы имеет важное как теоретическое, так и практическое значение. Выяснение химизма ферментативного гидролиза, выделение и изучение свойств очищенных целлюлаз позволит использовать их для практических целей разложения различных целлюлозосодержащих субстратов и обогащения последних белком и усвояемыми углеводами. Изучение микроорганизмов, обладающих активными целлюлозолитическими свойствами, имеет значение для мероприятий по предохранению целлюлозосодержащих материалов и сооружений от разрушения. Значение этого природного полимера исключительно велико также в связи с тем, что различные производные клетчатки в настоящее время используются в промышленной синтетической химии при производстве искусственных тканей и других важных в технике и быту веществ.

Целлюлоза является полисахаридом, полимерная цепь которого состоит из глюкозных единиц, связанных β-глюкозидными связями (пиранозные кольца глюкозы связаны друг с другом через C_4) (рис. 9). Число глюкозных остатков в цепи (степень полимеризации) колеблется в значительных пределах — от 15 до 7000—10 000 в молекуле [29, 30].

Молекулы целлюлозы, имеющие нитевидную форму, соединены в пучок (мицеллы) при помощи водородных связей. Такое строение объясняет характерные механические свойства целлюлозы и определяет ее техническое значение.

Строение мицелл неодинаково у целлюлоз различных растений. Наряду с «кристаллическими» имеются «аморфные» участ-

ки, которые, по-видимому, более чувствительны к воздействию целлюлаз. Степень «кристалличности», полимеризации и замещения, степень ориентации имеют значение при ферментативном гидролизе целлюлозы. Только у отдельных видов растений целлюлоза представляет собой почти чистый полимер (хлопок), у большинства же она связана с полисахаридами, имеющими более короткие цепочки в полимерной цепи (ксилан, целлю-

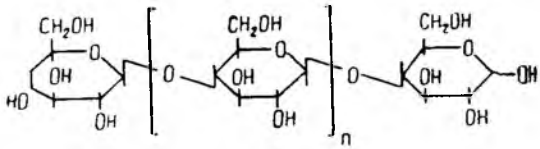


Рис. 9. Строение целлюлозы: фрагмент цепи молекулы (по Кочеткову и др.).

лозаны), пектином, лигнином. Генезис целлюлозы высших растений во многом не ясен. Предполагают, что она образуется путем полимеризации соединений с более короткими полимерными цепями [6]. Остаются также невыясненными и многие вопросы гидролиза целлюлозы. Установлено, например, что как при кислотном, так и при ферментативном гидролизе целлюлозы часть ее не подвергается разложению. Предварительно не измененная кислотным гидролизом целлюлоза почти не гидролизуется целлюлазой определенных видов бактерий и грибов, в то время как гидролизованная в значительной степени превращается в глюкозу (до 95%). Среди продуктов ферментативного расщепления целлюлозы установлена глюкоза, а в ряде случаев ее появлению предшествует дисахарид целлобиоза и целлоолигосахариды. Разложение целлюлозы производится комплексом целлюлозолитических ферментов, осуществляющих определенные этапы гидролиза молекулы целлюлозы. Этот комплекс составляют:

Целлюлазы, гидролизующие нерастворимые целлюлозные субстраты с неупорядоченным разрывом β-1,4-глюкозидных связей в молекуле целлюлозы.

Целлюлазы, осуществляющие гидролиз растворимых целлюлозных субстратов с разрывом β-1,4-глюкозидных связей в любом месте полимерной цепи (неупорядоченный или эндогидролиз) или только с нередуцированного конца ее (экзогидролиз).

β-Глюкозидазы, гидролизующие целлобиозу или некоторые другие β-глюкозиды, иногда обладающие β-глюкозилтрансферазной активностью.

β-Глюкозилтрансферазы, образующие β-связанные олигосахариды из целлобиозы, ламинарибиозы, метил-β-глюкозида и салицина.

Указанные комплексы ферментов более подробно изучены у *Asp. niger, Myrothecium verrucaria, Trichoderma viride, Tr. koningii, Stachybotrys atra* [49, 50—53, 62—67, 69, 71, 75, 79—83, 87, 97—105, 107, 123—129, 137—141 и др.].

В зависимости от характера действия на различные субстраты определяют наличие определенных целлюлаз. Голлиуэлл [53] считает, что истинные целлюлазы определяют по степени деградации нативной целлюлозы под их воздействием, выражаемой потерей веса ее; карбоксиметилцеллюлазы определяются по разложению карбоксиметилцеллюлозы (по потере вязкости и образованию редуцирующихся веществ).

Уайтэкер [141] также придерживается мнения, что целлюлозолитические ферменты, вызывающие разложение природных целлюлозосодержащих субстратов (волокон, хлопчатника, набухшей целлюлозы, целлофана), определяются по потере их веса и образованию редуцирующих веществ. При установлении наличия ферментов, разрушающих коллоидальную или мягко деградированную целлюлозу, их действие определяется первоначально по образованию зоны просветления субстрата, а затем — по образованию редуцирующих веществ. Наличие и активность целлюлозолитических ферментов, разлагающих растворимые производные целлюлозы (карбоксиметилцеллюлозу и др.), определяют первоначально по изменению вязкости их растворов и затем по образованию редуцирующих сахаров. Наконец, при изучении ферментов, разлагающих растворимые β-1,4-олигосахариды, их наличие и активность определяют по образованию сахаров, составляющих концевые группы их молекулы.

Считают, что гидролизу целлюлозы предшествуют определенные изменения состояния ее молекулы, выражающиеся в «набухании» волокон (фибрилл), разрыве водородных связей, изменении цепи молекулы и т. п. [108, 109].

Хотя по химическому строению целлюлоза является близкой к другому весьма распространенному полисахариду — крахмалу, ее молекула значительно более устойчива к микробному гидролизу.

Микробиология целлюлозы в отношении бактерий в отечественной литературе обстоятельно представлена исследованиями А. А. Имшенецкого и его сотрудников и обобщена в монографии «Микробиология целлюлозы» [6]. Нельзя не согласиться с автором, что изучение грибов, разрушающих клетчатку, может стать предметом специального раздела микробиологии целлюлозы — «микологии целлюлозы», который в последнее время начинает успешно развиваться.

В литературе имеются многочисленные указания о наличии видов грибов, в том числе и микроскопических, на различных целлюлозосодержащих субстратах как в природе, так и при их промышленном использовании.

Многие виды, особенно почвенных микроскопических грибов, обнаружены при изучении процессов разложения растительных остатков и образования почвенного гумуса.

Впервые целлюлозоразрушающие свойства грибов установил де Бари. Это был экстракт мицелия *Botrytis* sp., разрушающий клеточные оболочки растений, он же дал название цитазы ферменту, производящему этот процесс.

Затем было установлено цитолитическое действие древоразрушающего гриба *Merulius lacrymans*. Конинги считал, что грибы имеют бо́льшее значение, чем бактерии, в разложении растительных остатков и образовании гумуса. В частности, он отметил ряд видов почвенных целлюлозообразующих грибов и в их числе *Trichoderma* sp., которая, по мнению автора, принимает участие в разложении растительных остатков и гумификации на всех их стадиях. В дальнейшем многими авторами было отмечено значительное число видов микроскопических грибов, разных систематических групп, поражающих целлолозосодержащие субстраты. К ним относятся: *Mucor* sp., *Botrytis* sp., *Sclerotinia sclerotiorum, Trichothecium roseum, Cladosporium herbarum, Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Chaethomium* sp., *Stachybotrys atra, Myrothecium verrucaria, Trichoderma koningii, Agrostalagmus cinnabarinus* и некоторые другие. При этом можно отметить, что такие виды, как *Cladosporium herbarum, Alternaria* sp., *Chaethomium* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., отмечены в большинстве случаев как почвенные целлюлозоразрушающие грибы.

Распространение целлюлозолитических грибов в разных типах почв изучалось рядом авторов в СССР и за рубежом [1, 5, 7—11, 24, 37, 46, 74, 88, 130, 131 и др.].

К видам микроскопических грибов, преимущественно отмеченных на целлюлозосодержащих сырье и изделиях, могут быть отнесены: *Stachybotrys alternans, Monilia sitophila, Aspergillus* sp. [10, 25, 47, 68, 72, 73, 75 и др.].

Венкате [133, 134] на основании изучения целлюлозолитических свойств 23 видов фузариев при культивировании на фильтровальной бумаге и бактериальной целлюлозе из *Acetobacter xylinum* отметил, что целлюлозолитическая активность фильтратов связана со степенью роста на фильтровальной бумаге, которая была различна для отдельных видов. При этом бактериальная целлюлоза оказалась более пригодной для большинства изучавшихся культур, чем фильтровальная бумага. Наиболее активное разрушение фильтровальной бумаги наблюдалось у *Fusarium sporotrichiella*. Целлюлозолитическая активность в зависимости от условий культивирования (содержания и форм источников азота, углеводов, минеральных элементов) изучена автором у *Fusarium culmorum*. Наличие сахарозы или

глюкозы в среде в концентрации 4 *г/л* способствовало разрушению бактериальной целлюлозы, но не фильтровальной бумаги; высокие концентрации углеводов (20 *г/л*) подавляли целлюлозолитическую активность гриба. Отмечены оптимальные для целлюлозолитической активности гриба концентрации фосфора, калия, магния, цинка, бора.

Было установлено [120], что целлюлозолитическая активность *Verticillium albo-atrum* по отношению к метилцеллюлозе, целлофану снижается при культивировании гриба на средах с целлюлозой и углеводами — глюкозой, сахарозой, крахмалом, лактозой, а целлюлозолитическая активность видов *Chaethomium,* обильно образующих перитеции *(Ch. indicum, Ch. globosum),* более высокая, чем видов, слабо образующих перитеции [20]. Отмечено, что добавление в среду пептона и дрожжевого экстракта тормозит образование перитециев и угнетает целлюлозолитическую активность.

Басу и Гхоз [19] при исследовании целлюлозолитических свойств 124 культур разных видов грибов, культивированных на различных целлюлозосодержащих субстратах (джут, обработанный щелочью, гемицеллюлоза из джута и фильтровальная бумага), у 15 из них выявили образование фермента на всех субстратах, у 48 — на фильтровальной бумаге, у большинства — на смешанных целлюлозосодержащих субстратах. По данным авторов, активными продуцентами целлюлаз были *Penicillium variabile* и *Aspergillus terreus,* которые значительно шире распространены в природе, чем *Myrothecium verrucaria*, и могут иметь значение в процессах разложения целлюлозных субстратов в природе.

С целью подбора активных штаммов Веселов, Салманова, Буканова и Нуждина [2] изучали цитолитические свойства 19 культур разных видов грибов. При выращивании их на среде из древесных опилок с дрожжевым автолизатом и солодовыми ростками (или пивной дробиной) в течение семи дней наиболее целлюлозолитически активными штаммами были следующие: *Aspergillus amstelodany, Asp. oryzae, Trichothecium roseum, Cephalosporium* sp. Неактивны в этих условиях штаммы *Alternaria* sp., *Chaethomium globosum, Coniophora cerebella, Penicillium brevicompactum, Pen. cyclopium, Stachybotrys atra.*

Изучение целлюлозолитических свойств грибов и их ферментов в направлении сравнительной характеристики целлюлозолитических свойств различных систематических групп является весьма необходимым. С другой стороны, особенно важно выяснение условий биосинтеза целлюлаз, их выделения, очистки, изучения свойств. Это последнее направление имеет не только теоретическое, но и большое практическое значение, являясь основой для использования целлюлазы при гидролизе многих природных целлюлозосодержащих субстратов.

Наиболее изученными микроскопическими грибами в этой серии являются: *Myrothecium verrucaria, Stachybotrys atra, Trichoderma viride, Aspergillus niger.*

Соундерс, Сиу, Дженест [107] получили целлюлозолитически активный фильтрат *M. verrucaria* при культивировании на минеральной среде с микроэлементами и фильтровальной бумагой, как единственным источником углерода (3% по весу).

Заражали среду взвесью (10 *мл/л* среды) конидий гриба из трехнедельной культуры на фильтровальной бумаге (около 80 000 конидий в 1 *мл*). Гриб выращивали 10 дней при 30° С и перемешивании (500 *мл* воздуха в минуту; качалка — 150 *об/мин*). Отфильтрованная от мицелия культуральная жидкость обладала целлюлозолитическими свойствами при хранении при —5° С в течение нескольких месяцев.

Активность целлюлазы в опытах авторов определялась через четыре дня при 30° С по образованию редуцирующих сахаров в реакционной смеси, состоящей из 5 *мл* диализированной культуральной жидкости гриба +5 *мл* 0,05 М фосфатного буфера (pH 5,0) +100 *мг* обезжиренной, размельченной целлюлозы. Определялась также степень разрушения по потере веса таких субстратов, как целлофан, размельченный порошок фильтровальной бумаги, хлопок.

Продуктом ферментного гидролиза клетчатки является глюкоза. Фермент целлюлаза термолабилен (инактивация 40—50° С), оптимум pH 5—6; активен pH 5—9.

В опытах Рииса, Сиу и Лайвенсона [97], изучавших способность ряда микроорганизмов усваивать различные производные нативной целлюлозы в связи с механизмом ферментного ее гидролиза, при испытании 30 культур грибов и бактерий наиболее активными оказались: *Aspergillus flavus, Asp. niger, Asp. sydovii, Asp. fumigatus, Asp. luchnensis,* а также *Myrrothecium verrucaria.*

Грибы культивировались на минеральной среде с 0,01% дрожжевого экстракта, pH 6,3, с 0,5—1% различных производных целлюлозы, характеризующихся разной степенью замещения (число замещенных групп в ангидроглюкозной единице) и полимеризации (число ангидроглюкозных единиц в молекуле). Наряду с нативной целлюлозой (грубое и отбеленное хлопковое полотно) авторы изучали разложение грибами карбоксиметилцеллюлозы, ее натриевой соли, гидроксиметилцеллюлозы, метилцеллюлозы и др.

Грибы культивировались на жидких средах при 30° С (*Asp. fumigatus* — при 40° С) в течение 7—10 дней; затем фильтрат отделяли от мицелия и сохраняли в холодильнике для последующего изучения. При выращивании на плотных средах отмечалась визуально интенсивность разложения субстрата по образованию зон просветления.

Активность целлюлозолитических ферментов определялась по количеству образуемых редуцирующих веществ.

Реакционная смесь: 100 *мл* 1%-ной карбоксиметилцеллюлозы + 20 *мл* М/2 натрий щелочно-лимоннокислого буфера, pH 5,0+60 *мл* воды. Берется 9 *мл* смеси+1 *мл* культуральной жидкости гриба, инкубируется при 50° С два часа. Сахара определяли до начала инкубации и через разные промежутки времени в течение срока инкубации.

Проведенные опыты показали, что рост большинства испытанных микроорганизмов с быстрым растворением субстрата был хороший на карбоксиметилцеллюлозе с низкими степенями замещения. В средах с производными целлюлозы с высокой степенью замещения не отмечалось просветления среды до 30 дней роста. Метилцеллюлоза в опытах авторов была более устойчивой к микробному разложению, чем карбоксиметилцеллюлоза, гидрометилцеллюлоза. Изменение вязкости раствора, по мнению авторов, является первичным показателем изменения степени полимеризации при гидролизе целлюлозы, а растворимость субстрата — изменением степени замещения. Согласно данным авторов [97], биологическое разрушение целлюлозы может происходить в двух направлениях:

1. Превращения нативной молекулы целлюлозы в линейные ангидро-глюкозные цепочки (C_1);

2. Гидролиз β-1,4-глюкозидных связей и образование растворимых сахаров (C_x-ферменты).

При дальнейшем изучении целлюлозолитических свойств *Myrothecium verrucaria* Риис и его сотрудники пришли к выводу, что целлюлозолитический комплекс этого гриба имеет поликомпонентную структуру [27, 98—100].

К несколько иным выводам о структуре целлюлазы этого гриба пришел Уайтейкер [137, 140]. Следует, однако, отметить, что условия культивирования гриба в опытах автора были отличные от примененных другими исследователями, а это, по-видимому, влияло на результаты.

Гриб выращивали на качалке с 113 *об/мин.* Заражение производили инокулюмом из конидий пятидневного возраста на целлюлозном агаре при 30° С (взвесь конидий с одного агарового косяка на 300 *мл* среды).

Специфическим субстратом служили предварительно обработанные бензолом и этанолом волокна хлопчатника в количестве 30 *г/л*. Продолжительность культивирования — 12 дней при сильной аэрации и перемешивании.

Фильтрат, охлажденный до 5° С, осаждают на суперцентрифуге; сохраняют при —1° С.

Определение целлюлазной активности. Субстрат — набухшие волокна целлюлозы хлопка и «осажденная» целлюлоза. Активность определяли по образованию редуцирующих веществ.

Реакционная смесь: 10 *мл* ацетатного буфера, pH 6,6, антисептик+300 *мг* бычьего альбумина+200 *мг* субстрата, раствор фермента и дистиллированная вода до конечного объема 20 *мл*. Инкубация при перемешивании 17 *час*, 35° С. Смесь центрифугировали при 2000 *об/мин*. Концентрация нативного фильтрата (около 30 *л*) производилась упариванием под вакуумом и вымораживанием при —12° С до 1/10 объема.

При первом осаждении целлюлазы из концентрированного раствора сульфатом аммония фермент при центрифугировании

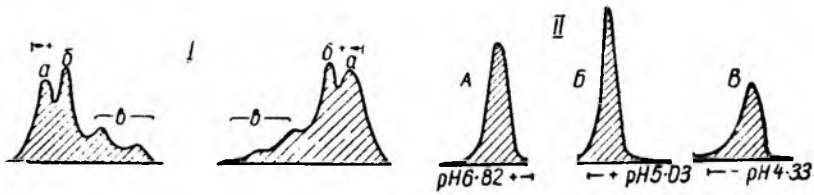


Рис. 10. Электрофоретические компоненты неочищенных экстрактов и очищенных препаратов целлюлазы *Myrothecium verrucaria* (по Whitaker):

I. Исходный, неочищенный экстракт фермента. Слева — восходящая граница, справа — нисходящая граница. Передвижение к аноду. Концентрация белка 0,61%, фосфатный буфер pH 6,8 (25° С), ионная сила 0,2, 0,020 амп., t 0,1° С. II. Очищенные препараты: *А*, *Б*, *В* — электрофоретически разделенные компоненты (0,020 амп., *t* 0,1° С, ионная сила 0,2, pH измерялось при 1° С). *А* — восходящая граница; время 221 *мин*; фосфатный буфер. *Б* — нисходящая граница; время 187 *мин*; ацетатный буфер. *В* — нисходящая граница; время 225 *мин*; ацетатный буфер.

(10 000 *об/мин*) образовывал один пик; при электрофорезе выявилось несколько компонентов — слабо подвижный при pH 6,8, средне подвижный и сильно подвижный. Наибольший выход фермента и содержание белка наблюдались во втором компоненте (рис. 10).

Исходя из данных электрофоретического изучения исходного препарата, автор провел дальнейшее фракционированное осаждение сульфатом аммония, этанолом (табл. 8), полиметапикриновой кислотой. Осадок белка при 50%-ном насыщении сульфатом аммония содержал компоненты первый и третий, а при 100%-ном насыщении — второй, обладающий целлюлозолитической активностью в отношении набухших волокон, осажденной целлюлозы и целлобиозы. При осаждении 10—25%-ным спиртом преобладал третий компонент на электрофорезе при pH 6,8.

Изучению целлюлозолитических свойств *Myrothecium verrucaria* посвящен ряд работ Голлиуэлла [50—52].

В опытах автора гриб выращивался на минеральной среде с целлюлозным порошком или обезжиренными волокнами хлопка при 28° С при слабом встряхивании в течение 1—3 недель. Фильтраты после отделения мицелия и остатков целлюлозы очищались ультрацентрифугированием (20 000—54 000 *об/мин*)

Таблица 8

Фракционирование этанолом исходного экстракта целлюлозы *Myrothecium verrucaria* (при pH 5,0 и ионной силе 0,02)

Фракции	Концентрация спирта для осаждения, %	T°C	Белок, *мг*	Активность целлюлазы, *ед*	Отношение целлюлазы к белку
Исходный концентрат (90 *мл*)	—	—	2920	2920	1,00
Фракция 1	5	—1	235	142	0,61
» 2	10	—7	75	51	0,68
» 3	15	—7	1715	2020	1,18
» 4	25	—12	509	613	1,21
Конечная надосадочная жидкость	—	—	253	—	—
Итого			2790	2830	

на протяжении 30 *мин* при 1° С и пропускались через бактериологический фильтр.

Единица целлюлозолитической активности определялась количеством фермента, вызывающим 70% гидролиза целлюлозы. Разложение последней определялось по образованию редуцирующих веществ и уменьшению веса клетчатки.

В качестве специфических субстратов были также использованы карбоксиметилцеллюлоза, нерастворимый целлюлозный порошок, набухшая целлюлоза, нативные и гидролизованные хлопковые волокна.

Целлюлозолитическая активность фильтратов *Myrothecium verrucaria* в опытах автора различна в зависимости от типа целлюлозного субстрата (табл. 9).

Таблица 9

Целлюлозолитическая активность *Myrothecium verrucaria*

Тип целлюлозы	Степень растворения, в % к исходному весу	
	через 1 *час*	через 22 *час*
Целлюлозный порошок . . .	—	3
Обезжиренное волокно хлопка	—	4
Набухший целлюлозный порошок	11	56
Набухшее целлюлозное волокно	8	45
Карбоксиметилцеллюлоза . .	0,4	—

Как видно из табл. 9, наибольшей целлюлозолитической активностью фильтраты *Myrothecium verrucaria* обладали в отношении набухшего целлюлозного порошка, в то время как гриб способен активно гидролизовать нативную целлюлозу (рис. 11). Оптимум pH целлюлазной активности фильтратов гриба при гидролизе набухшего порошка целлюлозы около 5,0. Очищенные препараты «целлюлазы» из *Myrothecium verrucaria* проявляли максимальную целлюлазную и карбоксиметилцеллюлазную активность при 50° С, pH 5—7 и не инактивировались пепсином и трипсином.

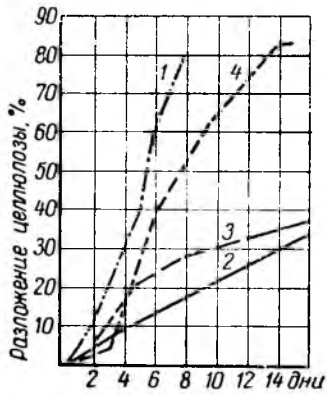


Рис. 11. Влияние условий культивирования на целлюлозолитическую активность *Myrothecium verrucaria* (по Holliwell).

Нативный порошок целлюлозы: *1* — погруженная культура; *2* — стационарная культура. Обезжиренные волокна хлопка: *3* — стационарная культура; *4* — погруженная культура.

В опытах автора показано, что целлюлазная и карбоксиметилцеллюлазная активность культуральной жидкости проявляется при разных условиях. Так, при повышении pH до 5,5 и температуре от 24 до 54° С целлюлазная активность фильтрата уменьшается значительно больше, чем карбоксиметилцеллюлазная.

Установлено также, что цитолитический фермент из фильтратов *Myrothecium verrucaria* обладает способностью в значительной степени адсорбироваться на нерастворимых целлюлазных субстратах.

Кооиман и сотр. [71] установили термолабильную фракцию целлюлазы *Myrothecium verrucaria*.

В их опытах гриб в течение трех недель выращивался на качалке при 30° С на среде с нативной целлюлозой. Препарат концентрирован осаждением сульфатом аммония (45 *г*/100 *мл*). При кипячении в течение 3 *мин* и кратковременном выдерживании до 110—120° С сохранялась активность по отношению к нативной целлюлозе, целлодекстринам и олигосахаридам до целлотриозы. Продуктами гидролиза были глюкоза и целлобиоза. Содержащиеся в исходном препарате целлобиаза, трансглюкозидаза термолабильны, инактивируются при кипячении.

Целлюлозолитическую активность различных фракций фильтрата *Myrothecium verrucaria* в отношении растворимой Na-сульфатцеллюлозы и нативной целлюлозы из пшеничных отрубей изучали Граймс, Данкен, Гопперт [49].

Гриб культивировался погруженным методом; заражение среды производилось взвесью конидий из двухнедельной культуры на плотной минеральной синтетической среде с фильтро-

вальной бумагой (2—14 биллионов). После двух-, трехнедельного роста активность фильтратов была от 7,3 до 21,8 *ед/мл;* исходных концентратов после осаждения — от 47 до 123 *ед/мл,* с содержанием белка от 0,083 до 0,2 *мг/мл* и специфической активностью от 453 до 647 *ед/мг* азота белка.

Авторы указывают, что как при осаждении ацетоном, так и при осаждении сульфатом аммония отмечаются значительные потери целлюлазной активности, содержания азота белка и специфической активности (*ед/мг* азота белка) в концентратах по сравнению с исходным.

При изучении концентрированных фильтратов методом конвекционного электрофореза установлено шесть белковых фракций с разной степенью подвижности, из которых одна обладала наибольшей активностью. Активные компоненты проявляли различный уровень активности в отношении растворимой и нативной целлюлозы. При этом три из этих шести электрофоретических компонентов были активны в отношении двух субстратов.

Авторы также считают, что многокомпонентная целлюлаза, различно активная по отношению к нативной целлюлозе и ее производным, по-видимому, широко распространена среди грибов, а соотношение отдельных компонентов зависит от условий культивирования.

В опытах Крука и Стона [3], изучавших продукты гидролиза β-глюкозидов у *Aspergillus niger,* использовался частично очищенный, целлюлозо- и целлобиозоактивный фермент гриба. При действии его на раствор целлобиозы (7,5%) в продуктах гидролиза в первые пять часов хроматографически обнаружены олигосахариды. Образование последних при гидролизе целлобиозы было также отмечено при действии фильтратов *Myrothecium verrucaria,* экстрактов культуры гриба *Asp. aureus* на отрубях.

Марти и Стон [86] изучили и описали свойства фракций β-глюкозидаз *Asp. niger,* полученных при адсорбции на кальцийфосфатном геле и последующем разделении на ионообменных смолах.

Джермин [62—67] в серии работ, посвященных изучению целлюлаз и β-глюкозидаз у *Asp. oryzae* и особенно *Stachybotrys atra,* установил наряду с целлюлазой наличие комплекса β-глюкозидаз, образуемых при культивировании на средах, не содержащих целлюлозы и более или менее специфических к определенным субстратам. При выращивании в погруженной культуре на средах, не содержащих целлюлозных субстратов, в культуральной жидкости образуются β-глюкозидазы.

Наиболее пригодным источником углерода для *St. atra* при погруженном культивировании был крахмал (1%). На крахмалсодержащей среде отмечено наличие в культуральной жидкости и мицелии *St. atra* целлобиазы, инвертазы, 2-нафтил-β-

галактозидазы, фенил-β-глюкозидазы, р-нитрофенил-β-глюкозидазы и незначительного количества фермента, гидролизующего салицин. Из культуральной жидкости концентрированные препараты ферментов β-глюкозидазы получены путем осаждения двумя объемами этанола, затем, после диализа,— повторным переосаждением 1-н. раствором уксуснокислого свинца. Разделение неочищенного препарата производилось фракционированной элюцией с колонки (углекислый магний+целлюлоза) сульфатом аммония. Наибольшая элюция β-глюкозидаз с колонок наблюдалась при использовании 4% сульфата аммония.

По данным автора, неочищенные препараты β-глюкозидазы *Asp. oryzae* состоят не менее чем из восьми компонентов, *Stach. atra* — из четырех компонентов, способных к гидролизу β-глюкозидных связей разных субстратов и вызывающих деполимеризацию Na-карбоксиметилцеллюлозы. Среди компонентов *Asp. oryzae* отмечены активные по гидролизу β-глюкозидных связей р-нитрофенил-β-глюкозида. Из неочищенных препаратов β-глюкозидаз *St. atra* не менее четырех компонентов оказались активными в отношении гидролиза β-глюкозидов (но не целлобиозы), набухания и потери вязкости растворов растворимых производных целлюлозы и некоторых нативных целлюлозных субстратов. Изучены условия биосинтеза β-глюкозидаз и целлюлаз и их свойства при росте гриба на среде с Na-карбоксиметилцеллюлозой.

Данные Джермина, как и других авторов, показывают, что комплекс ферментов, на разных стадиях гидролизующих различные целлюлозные субстраты, их свойства, меняются от условий культивирования и биологических свойств разных видов целлюлозолитических грибов.

β-Глюкозидазы, выделенные из продажных препаратов целлюлазы *Asp. niger,* который используется в США для получения этого фермента, изучались Кингом и сотрудниками [69, 75]. Разделение водного раствора неочищенного фермента из культуры *Asp. niger* произведено на колонках Сефадекса g 25. Установлено наличие пяти пигментных фракций (двух широких подвижных серо-коричневых точек, расположенных рядом, желтой, янтарного цвета фракции), из которых только одна (серо-коричневая) обладала ферментной активностью. При дальнейшем фракционировании этого компонента получено восемь высокоактивных препаратов β-глюкозидаз и изучены их ферментативные, химические и иммунологические свойства. Отдельные компоненты различались между собой не менее чем по двум из 14 таких свойств, как спектр в УФ свете, pH действия, субстратная специфичность, термостабильность, кинетика гидролиза субстрата, константы Михаэлиса—Ментена, адсорбция на целлюлозе, декстранных гелях и др. Авторы не считают, что наличие отдельных, четко отличимых по свойствам фрак-

ций является показателем процесса частичной денатурации фермента. По-видимому, β-глюкозидаза *Asp. niger* представляет комплекс ферментов. С другой стороны, отмечена определенная связь между ними и трудность получения чистых компонентов, что, по мнению авторов, может быть основанием для предположения об однокомпонентной природе β-глюкозидаз *Asp. niger.*

Обстоятельное изучение целлюлозолитических свойств и ферментов проведено Тояма у грибов *Trichoderma koningii, Tr. viride.* Исследовано влияние культивирования гриба на средах с различными источниками углерода и других соединений, а также на природных субстратах на рост и целлюлозолитическую активность. Для получения фермента гриб выращивали на увлажненных и подкисленных пшеничных отрубях или их смеси с опилками (2 : 1) в течение трех-четырех дней при 25—30° С. Водный экстракт гриба обладал высокой амилазной и целлюлазной активностью в отношении целлюлозы, карбоксиметилцеллюлозы, целлобиозы. Очищенный препарат получался путем фракционного осаждения ацетоном и затем — сульфатом аммония, риванолом, этанолом, ацетоном. Экстракт культуры на опилках и отрубях осахаривал различные целлюлозосодержащие субстраты — рисовую солому, батат в течение 24—96 *час* с образованием 5—8% редуцирующих сахаров. Автором получен фермент в кристаллическом виде и изучен ряд его свойств [121—129].

Активность образования целлюлаз у *Trichoderma viride* и других видов микромицетов в зависимости от источников углерода в среде исследовалась Мандельс и Риисом [79, 80, 82]. При испытании 62 источников углерода отмечено образование целлюлазы *Trichoderma viride* по убывающей активности на средах с целлюлозой, лактозой, глюкозой и целлобиозой. Другие моно- и дисахариды, вполне пригодные для роста изучаемых грибов, не вызывали образования целлюлазы. Некоторые виды испытанных грибов образовывали целлюлазу при росте на среде с лактозой или целлобиозооктаацетатом.

Отмечено, что целлюлаза *Trichoderma viride* появляется первоначально в культуральной жидкости, затем аккумулируется в клетках мицелия гриба. Наличие в среде Со, Са и ряда других микроэлементов стимулирует биосинтез целлюлазы. Изучено влияние ряда других факторов. В опытах с растущим мицелием и отмытыми клетками, суспендированными в буфере с солями и различными источниками углерода, наибольшая активность образования целлюлазы обнаружена при использовании в качестве индукторов целлюлазы ее производных, целлобиозооктаацетата, лактозы, целлобиозы, салицина.

Целлюлозолитическую активность *Penicillium oxalicum* и *Helminthosporium cyclopium* изучали Таха, Элдан и др. [117—

119] при росте грибов в течение 10 дней на среде Чапека—Докса с фильтровальной бумагой. Целлюлозолитическая активность определялась в экстрактах из мицелия и культуральной жидкости по потере вязкости 1,5% раствора карбоксиметилцеллюлозы и гидролизу 1% раствора целлобиозы. Установлено различие в составе комплекса целлюлозолитических ферментов в мицелии и культуральной жидкости изучаемых видов грибов. Культуральная жидкость обладала высокой целлюлазной и низкой целлобиазной активностью, мицелий, наоборот,— более высокой целлобиазной и низкой целлюлазной активностью.

Аналогичные данные получены авторами при изучении активности осажденных из мицелия и культуральной жидкости препаратов ферментов. Наибольшая целлюлозная активность культуральной жидкости в 7—10-дневном возрасте падает к концу второй недели. Для культуральной жидкости из *H. cyclopium* оптимальные pH 5,0 и t 40° С, из *P. oxalicum* —pH 4,0 и t 40° С.

Авторами получены целлюлазы и установлены условия их действия на целлюлозные субстраты.

Наряду с изучением целлюлозолитических ферментов отдельных видов микроскопических грибов с целью определения их свойств и механизма гидролиза целлюлозы наметилось другое направление — выяснение роли этих ферментов в патогенезе некоторых широко распространенных заболеваний сельскохозяйственных растений.

Это направление представлено рядом работ по изучению целлюлозолитических свойств отдельных форм *Fusarium oxysporum,* вызывающих увядание томатов, льна, бананов и других растений; *Cladosporium cucumerium, Pythium aphanidermatum,* поражающих плоды огурцов; *Rhizoctonia solani* — возбудителя ризоктониоза картофеля и др.

Кольмейер [70] определял целлюлозолитическую активность разных видов фитопатогенных грибов по активности роста и разрушения целлофана. Грибы сеяли на взвешенные стерильные пленки целлофана в растворе Кнопа. Спустя две недели определяли рост мицелия и степень разрушения целлофана, которая для разных видов колебалась от 0,9 до 40%. *Fusarium sp., Gleosporium nervisegium, G. clasticae, Pestallozzia cinerea, Alternaria tenius* вызывали поверхностную коррозию целлофана и разрушали его; *Botrytis cinerea* вызывал только поверхностную коррозию, а *Rhizoctonia solani* рос на поверхности пленки. При добавлении в среду углеводов разложение целлюлозы подавлялось.

Автор не отмечает связи между патогенностью грибов и целлюлозолитической активностью.

Хусейн и Даймон [57—59] изучили целлюлозолитические свойства *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* — возбудителя увя-

дания томатов. Авторы предполагают, что в патогенезе заболевания роль целлюлазы гриба заключается в подготовке благоприятных для роста гриба источников питания из клеточных оболочек растения-хозяина и непосредственном токсическом действии на растение.

Для получения целлюлазы сильно патогенный штамм гриба *Fus. oxysporum* f. *lycopersici* выращивали на среде Ричардса с 0,01% дрожжевого экстракта. В качестве субстрата были испытаны фильтровальная бумага, древесная целлюлоза, волокна хлопка, карбоксиметилцеллюлоза, солома, влажные стебли томата. Культивирование производилось в колбах на качалке в течение четырех—шести дней; затем культуральную жидкость центрифугировали и использовали для изучения целлюлозолитической активности. Последняя определялась степенью потери вязкости карбоксиметилцеллюлозы и образованием сахаров при гидролизе целлюлозы. Наибольшая активность целлюлазы была при выращивании *Fus. oxysporum* f. *lycopersici* на среде со стеблями томатов, затем на карбоксиметилцеллюлозе, древесной целлюлозе (табл. 10).

Таблица 10

Влияние источников углерода на образование целлюлазы *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*

Источник углерода	Относительная активность фермента*
Глюкоза	7
Хлопковые волокна	15
Фильтровальная бумага	140
Древесная целлюлоза	1110
Стебли томатов	2500
Карбоксиметилцеллюлоза	1425

* Активность выражалась как эквивалент времени (*мин*×1000) к 50 % потере в вязкости субстрата.

Концентрированный фермент целлюлазы из культуральной жидкости *F. oxysporum* f. *lycopersici* получен по схеме:

1. Исходная культуральная жидкость (5 *л*) концентрируется до 500 *мл* при 30° С и пониженном давлении.

2. Добавляется 225 *мл* концентрированного раствора сульфата аммония+25 *мл* 1 М фосфатного буфера и оставляется на ночь.

3. Центрифугируют. Осадок удаляют, жидкость стоит четыре дня при 5° С с насыщенным сульфатом аммония.

4. Центрифугируют. Осадок растворяют в 100 *мл* воды и прибавляют четыре объема насыщенного сульфата аммония.

5. Центрифугируют. Осадок снова растворяют в 100 *мл* воды; на протяжении 48 *час* диализируют против дистиллированной воды. Раствор фермента сохраняется при 5° С без значительной потери активности в течение нескольких месяцев.

Полученный авторами очищенный препарат целлюлазы обладал высокой степенью активности и при испытании его действия на сеянцы томатов вызывал потерю тургора (через 16 *час*) и полное, почти необратимое их увядание (через 20 *час*).

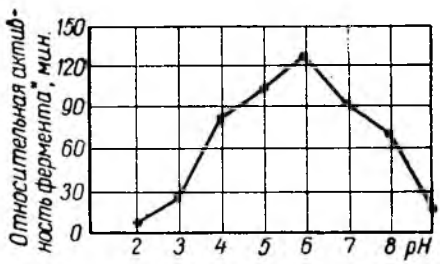


Рис. 12. Влияние pH на активность целлюлазы *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (по Husain).

* Время, необходимое для потери 50% вязкости раствора.

Целлюлаза гриба *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* проявляет активность при pH 2—9 (рис. 12) с оптимумом 6,0; ион ртути угнетал в концентрации 10^{-3} М, но дитиокарбомат цинка и 8-хинолинол сульфат не угнетали.

Диис и Штэкман [35] изучили активность образования целлюлозолитических ферментов *Fusarium oxysporum* f. *cubense* на тканях устойчивых и чувствительных сортов растения. Гриб, адаптированный предварительно к среде с глюкозой и пектином, на тканях чувствительного сорта бананов образовал целлюлазы в 3—13 раз больше, чем на тканях устойчивого сорта (табл. 11).

Как видно из приведенных в табл. 11 данных, активность образования целлюлазы зависит также от состава среды.

Авторы считают, что в результате первоначального разрушения сосудистой системы растения другими, в частности пектолитическими, ферментами гриба освобождаются микрофибриллы целлюлозы сосудов растения и подвергаются действию грибной целлюлазы. В результате ее действия может разрушаться лигнино-целлюлозный комплекс с освобождением высокомолекулярных соединений, блокирующих сосудистую систему. Это один из механизмов увядания растения. В общем аспекте, по-видимому, авторы правы, считая, что чувствительность растений связана с активностью гидролитических процессов, способствующих обильному росту возбудителя, а устойчивость — с понижением или подавлением гидролитической активности возбудителя, ограничением его роста.

Уайнстид и Камбз [144] обнаружили незначительную целлюлазную активность гриба *Pythium aphanidermatum,* поражающего плоды огурцов, особенно во влажную погоду. Активность целлюлазы в опытах авторов определялась по потере вязкости 1,2% раствора карбоксиметилцеллюлозы (pH 5,3, 37°), а также

Таблица 11

Активность образования целлюлазы *Fusarium oxysporum* f. *cubense*, выращенного на ложностеблевой ткани устойчивого и чувствительного сортов растения (при 28° С, в течение семи дней)

Чувствительность сорта растения	Карбоксиметилцеллюлазная активность* гриба, предварительно выращенного на среде Чапека с	
	глюкозой	пектином и глюкозой
Чувствительный к фузариозному увяданию	12,3	15,6
Устойчивый к нему	4,8	1,3
» » »	8,2	4,9
» » »	2,2	1,1

* Активность целлюлазы определялась по образованию редуцирующих сахаров при действии фильтратов гриба на карбоксиметилцеллюлозу.

Реакционная смесь: 1 *мл* 0,5 М цитратного буфера pH 5,0 + фильтрат или экстракт гриба + 3 *мл* 1 %-ного раствора карбоксиметилцеллюлозы, при 37°С.

образованием редуцирующих сахаров. Наиболее активными были фильтраты на среде с глюкозой и экстракты из огурцов, зараженных грибом. Гриб не использует целлюлозу как источник углерода, не гидролизует карбоксиметилцеллюлозу до целлобиозы, а на среде с целлобиозой последняя гидролизовалась до глюкозы.

В то же время у *Cladosporium cucumerinum* Штрайдер и Уайнстид [116] отметили значительную целлюлазную активность как при росте гриба на средах с целлюлозосодержащими субстратами, так и в соке больных растений, пораженных этим видом гриба.

Авторы сообщают, что без добавления 0,1% дрожжевого экстракта был плохой рост гриба на среде с фильтровальной бумагой, карбоксиметилцеллюлозой.

Каррет [24] установил целлюлозолитическую активность фитопатогенного гриба *Rhizoctonia solani,* который хорошо растет и разрушает целлюлозу и целлюлозосодержащие субстраты при культивировании в почве.

Приведенные данные об изучении целлюлозолитических свойств некоторых фитопатогенных грибов представляют интерес и могут иметь значение в нескольких направлениях. Они пополняют наши сведения о грибах — активных продуцентах целлюлозолитических ферментов; открывают возможное зна-

чение их в патогенезе отдельных грибных заболеваний растений.

Вышеприведенные данные по изучению целлюлозолитических свойств грибов являются значительным вкладом в познание путей ферментативного разложения целлюлозы, тем более значительным, что многие исследования были связаны с достижениями по изучению химии целлюлозы и ее физико-химических свойств. Выяснены некоторые особенности структуры мицелл целлюлозы, которые оказывают влияние на ее расщепление грибными ферментами. Предполагают, что наиболее чувствительна для ферментного гидролиза целлюлозы «аморфная» часть волокна, а также в значительной степени денатурированная и увлажненная целлюлоза [30, 109]. С достоверностью показано, что в то время как целлюлозолитические организмы, главным образом грибы, способны разлагать нативную и неизмененную целлюлозу, ферменты, выделенные из них, разлагают предпочтительно деградированную целлюлозу. Получены в очищенном виде препараты целлюлаз из отдельных видов микроскопических грибов, в большинстве случаев показана их многокомпонентная структура, изучены их свойства и некоторые стороны механизма действия на субстрат [53, 56, 141].

Достигнутые успехи, несомненно, создают благоприятные предпосылки для дальнейшего изучения этих ферментов у микроскопических грибов и их применения.

Гемицеллюлазы гидролизуют гемицеллюлозы, высокомолекулярные полисахариды, растворимые в щелочных растворах. Гемицеллюлозы наряду с клетчаткой содержатся в соломе, оболочках семян и плодов, древесине, кукурузных початках и других одревесневших растительных субстратах. При гидролизе образуют маннозу (маннаны), галактозу (галактаны), арабинозу, ксилозу (пентозаны, арабан, ксилан) или смесь некоторых из этих сахаров. В таких соединениях содержится меньше остатков соответствующих сахаров, чем глюкозы или целлобиозы в молекуле клетчатки. Считают, например, что в молекуле маннана имеется от 200 до 400 остатков маннозы, в молекуле галактана — около 120 остатков галактозы. Различные растительные отходы являются весьма пригодным материалом для получения пентозанов или других сахаров при их кислотном или ферментативном гидролизе.

Изучению этих ферментов у грибов посвящены отдельные работы.

Пентозаназы. Условия культивирования ряда микроскопических грибов (*Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* и др.) для образования пентозаназы изучал Саймпсон [110].

Грибы выращивали на минерально-углеводной среде, где в качестве источников углерода использовались пектин, ксилан, гемицеллюлозы, солома, отруби, водорастворимые пентозаны пшеницы, овса, свекловичная патока, сульфитные щелоки. Куль-

тивирование проводилось в колбах на круговой качалке (200 *об/мин*) при 30° С, в течение 60—72 *час.*

Активность пентозаназы определялась по потере вязкости растворов.

Реакционная смесь: 4 *мл* 1,125% раствора пентозана + 0,3 *мл* 0,75 М ацетатного буфера (pH 5,0) + 0,2 *мл* разведенного фермента (фильтрата гриба); инкубация при 30° С на протяжении 30 *мин.*

Условная единица активности — потеря 50% вязкости раствора при 30° С на 3 *мин.*

Биосинтез пентозаназы у изученных штаммов двух видов грибов происходил на различных средах (табл. 12).

Таблица 12

Влияние различных углеводов на образование пентозаназы *Aspergillus niger, Trichoderma viride*

Источник углерода в среде	Пентозаназа, *ед/мл*	
	Asp. niger	*Tr. viride*
Без углевода	0	0
Арабиноза	227	1000
Ксилоза	1490	6
Пектат натрия	14	70
Пентозаны муки	2860	570
Ксилан	839	2
Пшеничная солома	693	147
Гемицеллюлоза из пшеницы	2780	2770
Соломенная сечка	2000	570
Овсяная шелуха	254	69
Свекловичная патока	68	1
Жидкие сульфитные отходы	620	360

Среда: 2 % углевода; 0,4 % $(NH_4)_2 HPO_4$; 0,05 % аммония молочнокислого; 0,1 % KCl; 0,5 % $CaCO_3$; 0,103 % солевой смеси.

Наибольшая активность образования пентозаназ *Asp. niger* наблюдалась на среде с пентозами муки, гемицеллюлозой, соломенной сечкой, а также на среде с ксилозой; у *Tr. viride* наибольшая пентозаназная активность была на среде с гемицеллюлозой и на среде с L-арабинозой, а на среде с ксилозой фермент почти не образовывался. Стимулировалось образование пентозаназ у *Asp. niger, Tr. viride* добавлением к основной среде экстракта дрожжей, кукурузного экстракта, солода и др. Повышалась активность образования пентозаназ у *Tr. viride* также на среде с глютаминовой кислотой.

Автором рекомендована среда для производственного получения фермента, состоящая из 3% отрубей, 3% нейтрализованного аммонием кукурузного экстракта, 1% углекислого каль-

ция. На этой среде максимум образования пентозаназы у *Asp. niger* отмечен через 60 *час* ферментации при pH среды 5,0 (рис. 13).

Фермент, осажденный из культуральной жидкости 76%-ным этанолом, стабилен при 30° С в течение 30 *мин* в растворах с pH 4,0—5,8. В виде порошка при хранении на холоду (2° С) сохранялся без значительной потери активности до двух лет.

При изучении грибов, обладающих пентозаназной активностью, следует обратить внимание на их видовой состав, обнаруживаемый на соответствующих природных субстратах—соломе, кукурузной кочерыжке и др. [11]. Изучение специфических видов грибов на этих субстратах позволит выявить более активных продуцентов пентозаназ.

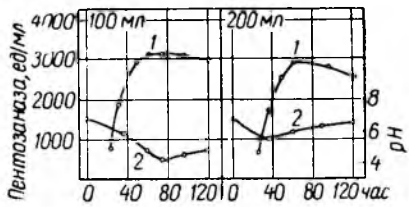


Рис. 13. Влияние аэрации на выход пентозаназы *Aspergillus niger* (по Simpson):
1 — образование пентазаназы; *2* — pH среды.

Ксиланазы гидролизуют ксиланы, являющиеся β-1,4- и β-1,3-ксилопиранозидными полисахаридами с одной или двумя боковыми цепочками, связанными между C_1 и C_2. Структура их изучена наиболее подробно у ксилана, выделенного из морской травы и водорослей. Обнаружены ксиланазы у бактерий и некоторых видов микроскопических грибов. Фукуйи, Сузуки с сотрудниками считают, что есть два фермента — β-1,4-ксиланаза, разрушающая β-1,4 связи ксилана, и β-1,3-ксиланаза, разрушающая β-1,3 связи ксилана [43—44].

Изучены условия образования и получены в кристаллическом и очищенном виде эти два фермента из видов *Aspergillus* и *Chaethomium.*

β-1,3-ксиланазная активность изучалась у штаммов *Asp. batatae, Asp. oryzae, Ch. globosum* и других видов.

Грибы выращивали на отрубях и синтетической среде следующего состава: глюкозы — 10 *г,* полипептона — 2 *г,* $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 2 *г,* $CaCO_3$ — 1 *г,* М/15 фосфатный буфер, pH 5,5, воды до 1 *л.*

Культивирование производилось на качалке при 30° С в течение 3—7 дней; заражали инокулюмом 24-часовой культуры. Из β-1,3-ксилана получены олигосахариды при слабом кислотном гидролизе (2% H_2SO_4) в кипящей водяной бане на протяжении 15 *мин,* последующей адсорбцией на угольно-целитной колонке (1 : 1) и фракционированной элюции дистиллированной водой и этанолом (табл. 13).

Субстрат для определения ксиланазной активности представлял желеподобный раствор β-1,3-ксилана, полученный при

Таблица 13

Разделение различных β-1,3-ксилоолигосахаридов колоночной хроматографией

Фракции	Растворитель для элюции	Главный компонент в каждом элюате
0	Дистиллированная вода	Ксилоза, глюкоза
1	5%-ный этанол	Ксилобиоза
2	15%-ный »	Ксилотриоза
3	25%-ный »	Ксилотетраоза
4	35%-ный »	Ксилопентаоза
5	45%-ный »	Ксилогектаоза

подогревании 5% его раствора в 0,25 М NaOH до 45° С и последующем разведении дистиллированной водой до 0,6%-ной концентрации (pH 3,5).

Активность β-1,3-ксиланазы определялась по потере вязкости раствора, образованию сахаров в процессе гидролиза.

Реакционная смесь: 1 *мл* 0,5%-ного β-1,3 раствора ксилана+0,4 *мл* 1 М фосфатно-солянокислого буфера, pH 3,5, раствор фермента до 2 *мл* конечного объема; инкубация при 45° С, 30 *мин*.

Из испытанных авторами около 100 культур микроскопических грибов незначительной β-1,3-ксиланазной активностью обладали фильтраты штаммов *Asp. oryzae, Asp. batatae* и только фильтраты штамма *Ch. globosum* интенсивно гидролизовали β-1,3-ксилан с образованием ксилозы. Наибольшая β-1,3-ксиланазная активность гриба при погруженной культуре отмечалась на пятый-шестой день, а β-1,4-ксиланазная — на второй-третий (рис. 14). Из культуральной жидкости этого штамма *Ch. globosum* получен и изучен очищенный фермент β-1,3-ксиланаза.

Выделение и очистка фермента из культуральной жидкости пятидневной культуры *Ch. globosum* проводились сульфатом аммония (фракционированное осаждение растворами разной степени насыщения, на холоду). Исходный фильтрат содержал 1,7 *ед.* β-1,3 ксиланазной активности на 1 *мг* белка; полученный очищенный фермент — 180 *ед.* Фермент, по данным опытов упомянутых авторов, является специфичным при гидролизе β-1,3-ксилана, образует только ксилозу и незначительное количество глюкозы, не гидролизует ксилозы и ксилобиозы, но гидролизует другие ксилоолигосахариды (см. рис. 14).

Гаскуан Дон. и Гаскуан М. [45] изучили ксиланазную активность 13 видов микроскопических грибов. Ксилан получен из испанского камыша. При его кислотном гидролизе отмечены ксилоза, арабиноза и следы глюкозы. Наиболее активными были штаммы *Penicillium viridicatum, Fusarium roseum* (=*F.*

avenaceum?), *Fus. avenaceum*. Дальнейшее изучение ксиланазной активности проведено со штаммом *F. roseum*.

Гриб выращивали в стационарной культуре 21 день при 30° С и в погруженной культуре 13 дней при 28—30° С. После отделения от мицелия культуральную жидкость концентрировали и замораживали до получения сухого порошка; последний

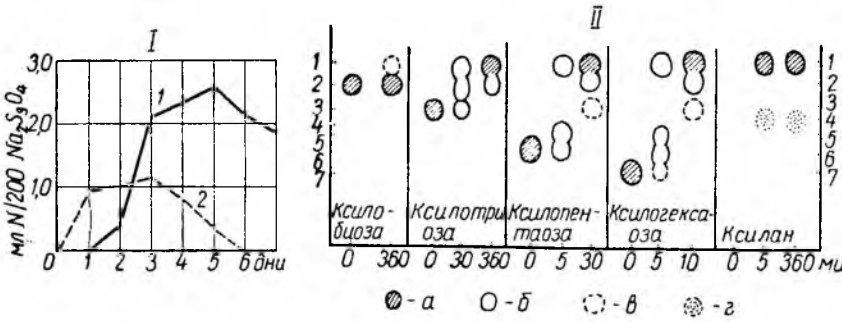


Рис. 14.

I. Образование β-1,3- и β-1,4-ксиланрасщепляющих ферментов в культуральной жидкости *Chaetonium globosum* (по Fukui). *1* — β-1,3-ксиланрасщепляющий фермент; *2* — β-1,4-ксиланрасщепляющий фермент.
II — Действие очищенных ферментов ксиланазы *Chaethomium globosum* на разные β-1,3-ксилоолигосахариды. Среда: 2% β-1,3-раствор ксилоолигосахарида — 0,5 *мл;* Фосфатный буфер pH 3,5—0,2 *мл;* растзор фермента 37 ед.— 0,3 *мл. 1* — ксилоза; *2* — ксилобиоза; *3* — ксилотриоза; *4* — глюкоза; *5* — ксилотетраоза; *6* — ксилопентаоза; *7* — ксилогексаоза. *а* — интенсивное проявление пятна; *б* — средняя степень проявления; *в* — слабая интенсивность; *г* —слабое коричневое окрашивание.

растворяли в воде (1 : 10), диализировали на протяжении 72 *час* на ацетилированной целлюлозной пленке.

Получение ксиланазного препарата проведено фракционированным осаждением спиртом на холоду (25, 40, 25,5% этанола).

При проверке целлюлазной и ксиланазной активности полученных фракций выявлена фракция (g), обладающая только ксиланазной активностью; при ее действии на ксилан в реакционной смеси выявлены ксилоза, арабиноза, следы глюкозы и ксилоолигосахариды, в то время как другие фракции обладали также и целлюлазной активностью (табл. 14).

Ксиланазы *Diplodia viticola* изучались Штребеллом [115] при культивировании на стерильном винограде, а также на синтетической среде с добавлением 1% ксилана, целлюлозы, L-арабинозы, d-ксилозы, d-глюкозы (каждого как единственного источника углерода). Ксилан получен из ягод винограда. При гидролизе его обнаружены ксилоза, арабиноза, глюкоза и галактоза в соотношении 20 : 5 : 6 : 6. В качестве исходного субстрата использован очищенный ксилан из кукурузных кочерыжек. При гидролизе виноградного ксилана ферментом гриба, полученным при культивировании на стерильном винограде, обнаружены хроматографически ксилоза, арабиноза, глю-

Таблица 14

Характер действия ксиланазы *Fus. roseum* (фракция g) на различные углеводы

Субстрат	Сахара, образуемые при гидролизе
Ксилоза	Ксилоза + следы ксилоолигосахаридов
Ксилобиоза	Ксилоза + ксилоолигосахариды
Ксилотриоза	Ксилоза + ксилобиоза + ксилоолигосахариды
Целлобиоза	Ксилоза + целлобиоза + целлоолигосахариды
Амилоза	Глюкоза
Арабоксилан (ржаная мука)	Ксилоза + арабиноза + олигосахариды
γ-целлюлоза (гель)	Ксилоза + гексоза + олигосахариды

коза, ксилобиоза, ксилотриоза, ксилотетраоза, ксилопентаоза.

При культивировании гриба на средах с различными источниками углерода (основная среда — 2 *г* $Ca(NO_3)_2$; 2 *г* Na_2SO_4; 0,64 *г* KCl; 0,65 *г* NaH_2PO_4; 0,025 *г* $MnSO_4$; 0,015 *г* $ZnSO_4$; 0,008 *г* KCl; 3,6 *г* $MgSO_4$ на 1 *л* воды) установлено, что активность ксиланазы зависит от источника углерода в среде (табл. 15). Отмечена разница в продуктах гидролиза ксилана неочищенными и очищенными препаратами ксиланазы, а также неодинаковый оптимальный pH для их действия. В первом случае обнаружены ксилоза, арабиноза и ксилоолигосахариды, во втором — только ксилоолигосахариды.

Таблица 15

Влияние различных источников углерода на образование ксиланазы *Diplodia viticola*

Источник углерода	Основные продукты гидролиза ксилана
Глюкоза	Не образуется
Целлобиоза	Не образуется
Целлюлоза	Ксилоолигосахарид
Ксилоза	Ксилоолигоксилоза, арабиноза, глюкоза
Арабиноза	То же
Ксилан	Ксилоолигоксилоза и неопределенные компоненты

При хроматографии осажденного ацетоном фермента на колонке диэтиламиноэтил целлюлозы (ДЕАЕ) установлено, что он состоит из двух компонентов.

Глюканазы вызывают гидролиз глюканов, полисахаридов, имеющих смешанные типы связи. Стоун [112] изучал β-глю-

каназы *Asp. niger*. При различных уровнях линейной концентрации градиента фосфатного буфера (pH 5,8) от 0,005 до 1 М/4 *л* и фракционном элюировании получены фракции, обладающие различной активностью. Специфические субстраты в этих опытах автора — набухшая целлюлоза, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, салицин. Так, например, компонент, элюированный при 0,0075 М фосфатного буфера, обладал активностью против первых двух субстратов; компоненты, элюированные при 0,03—0,05 М, были более активны в отношении карбоксиметилцеллюлозы, чем целлюлозы; компоненты при 0,055—0,07 М активны против двух этих субстратов. По отношению к салицину оказались активными компоненты, элюированные при 0,055—0,085 М. При других концентрациях были выделены компоненты, обладающие ламинариназной, глюканазной активностью.

Риис и сотрудники [102—105] изучали β-D-1,2, β-D-1,3, β-D-1,4 и β-D-1,6 глюканазы у грибов. Субстратом для исследования β-1,2-глюканазной активности у грибов служил β-D-1,2-глюкан, полученный из культуры бактерий *Agrobacterium tumifaciens* — возбудителя цветочных галлов. Фермент β-1,2-глюканаза представляет интерес для получения дисахарида софорозы при гидролизе β-D-1,2-глюкана, стимулирующего образование целлюлазы *Trichoderma viride*.

Максимальное образование фермента наблюдалось на 20-й день роста гриба; активность β-1,2-глюканазы (или β-1,3-, β-1,4-глюканазы) определялась по образованию редуцирующих сахаров (глюкозы) в реакционной смеси, состоящей из 0,5 *мл* раствора фермента (концентрированной жидкости) + 0,5 *мл* 0,4%-ного раствора β-1,2-глюкана (β-1,3- или β-1,4-глюкана соответственно) в 0,05 М цитратном буфере. Реакция в течение двух часов при 50° С.

Единица активности — количество фермента, вызывающего образование 0,4 *мг* глюкозы в 1 *мл* реакционной смеси. Активность образования β-1,2-глюканазы у различных видов грибов неодинаковая. Изучаемые авторами бактерии, актиномицеты и дрожжи не были активны.

Изучено влияние температуры, pH среды и концентрации субстрата на β-1,2-глюканазную активность наиболее активных видов грибов (рис. 15). Термоустойчивая целлюлаза *Myrothecium varrucaria* почти не гидролизует β-1,2-глюкана.

Авторы считают, что изученные ими β-1,4-, β-1,3- и β-1,2-глюканазы являются специфическими ферментами к гидролизу определенных типов связей глюкозидных единиц в полисахаридах. Исследование подобных ферментов, по их мнению, имеет значение для понимания структуры последних.

Честер и Балл [26] изучили β-глюканазы грибов, вызывающих разложение ламинарина. Полисахарид ламинарин — ман-

нитсодержащей β-1,3-глюкан, характеризующийся β-1,3-полимерной связью. Главным продуктом гидролиза ламинарина является маннит. Ламинарин широко распространен у водорослей семейства *Phalophycea;* впервые выделен у *Laminaria.*

Авторами изучена ламинариназная активность более 160 видов различных систематических групп, выделенных из различных субстратов.

Грибы выращивали на жидкой и плотной среде следующего состава: минеральная часть +1% нерастворимого ламинарина,

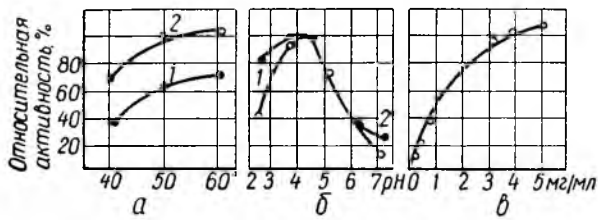


Рис. 15. Влияние некоторых факторов на активность β-1,2-глюканазы *Penicillium melinii, Pen. funiculosum* (по Reese):

а — влияние температуры на β-1,2-глюканазную активность *Pen. melinii; 1* — 30 *мин, 2* — 60 *мин;* pH 5,3; *б* — влияние pH на β-1,2-глюканазную активность *Pen. melinii* (1), *Pen. funiculosum* ОМ 391 (2); t 50° С; *в* — влияние концентрации субстрата на β-1,2-глюканазную активность *Pen. melinii;* t 40° С, pH 4.

0,25% дрожжевого экстракта, 0,25% пептона, по 5 *мг/л* $Fe^{\cdots}$, $Mn^{\cdot\cdot}$, $Co^{\cdot\cdot}$, pH 6—7. Культивирование проводили в колбах на качалке при заражении спорами 10^{-6}/*мл*.

Концентрированные препараты ламинариназ получались путем осаждения из культуральной жидкости, отделенной от мицелия, двумя объемами ацетона при 2—3° С. Через 14—15 *час* жидкость центрифугировали (2000 *об/мин*, при 1° С, 20 *мин*), осадок растворяли в минимальном объеме воды, диализировали против водопроводной воды, переосаждали в холодном эфире, высушивали в вакуум-эксикаторе и сохраняли при —12° С для дальнейших исследований.

Наличие ламинариназы в культуральной жидкости определялось первично по просветлению ламинаринового агара. Активность очищенного фермента — по образованию редуцирующих сахаров в реакционной смеси.

Реакционная смесь: 2,5 *мл* 0,5%-ного раствора ламинарина в 0,05 М цитратно-фосфатном буфере, pH 5,8+2,5 *мл* 1%-ного раствора очищенного фермента в этом же буфере; реакция при 37° С, 30 *мин*. Единица активности — количество *мг* глюкозы, а также специфическая активность на белок.

Наиболее ламинариназоактивными грибами в опытах авторов были *Trichoderma viride, Myrothecium verrucaria* (табл. 16).

Таблица 16

Ламинариназная активность разных видов грибов

Источник выделения	Вид гриба	Активность, *ед/мг* азота
Почва	*Cylindrocarpon radicicola*	8,5
	Penicillium violaceum	30,3
	Torula sp	19,4
	Trichoderma viride	340,0
Соленые морские заросли	*Cercospora salina*	34,0
	Diplodina sp.	3,1
	Mortierella alpina	6,2
Морская вода	*Cilcitalua achrospora*	3,2
Морские дрожжи	*Helicoma* sp.	5,6
		19,6
Разрушенный текстиль	*Rhodotorula* sp.	3,6
	Aspergillus niger	86,0
	Chaethomium cochlioides	42,0
	Myrothecium verrucaria	300,0
Гниющие волокна	*Polystictus versicolor*	72,0
	Ustilina sousta	28,5
	Xylaria polymorpha	79,0
Разрушающие гуминовые кислоты	*Penicillium luteum*	54,0
	Trametes rubescens	40,0
Кератинразрушающие	*Epidermophyton floccosum*	25,7
	Keratinomyces ajelloi	14.7

Авторы считают, что грибные ламинариназы многокомпонентны. При «эндогидролизе» ламинарина, по их мнению, образуются ламинаринодекстрины; как первичное соединение при «экзогидролизе» образуется глюкоза.

Методом адсорбционной хроматографии (на колонках Са-гидроксилапатита и целлюлозы) из β-глюкозидаз получены отдельные компоненты, специфичные по отношению к ламинарину.

Комплекс β-1,3-ламинариназ у разных видов грибов неодинаков; процесс гидролиза ламинарина осуществляется различным путем, связанным с образованием различных начальных и конечных его продуктов.

Авторы показали, что около 25% из 160 видов изученных грибов характеризуется «экзогидролитическими» ламинариназами, до 56% — «эндогидролитическими».

Как видно из приведенных данных (табл. 17), например, два наиболее активных штамма видов *Myrothecium verrucaria, Trichoderma viride* характеризуются разным соотношением «эндо» и «экзо» ламинариназного комплекса.

Таблица 17

Характеристика ламинариназ у разных видов грибов

Источник ламинариназы	Соотношение компонентов, %		Единиц в 1 *мг* белка всех ферментов
	Экзолитические	Эндолитические	
Морские дрожжи 13 М	3	97	19
Rhizopus nodosus № 245	17	83	71
Streptomyces sp. *S* 93.	20	80	24
Myrothecium verrucaria IM 2529	45	55	300
Базидиомицет Q M 806	82	18	103
Trichoderma viride STR	92	8	340

Ламинариназный комплекс изученных видов грибов, по данным авторов, включает «экзо»-β-D-1,3-ламинариназу, один или более «эндо»-β-D-1,3-глюканаз и β-глюкозидазу низкой степени специфичности к ламинарину.

Наряду с маннитом обнаружены глюкозиды с β-1,6 связью. Многокомпонентная природа ламинариназного комплекса грибов была также показана при изучении отношения ламинариназ различных видов к pH (табл. 18).

Таблица 18

Оптимальные pH для активности ламинариназы разных видов грибов

Вид гриба	Характер ферментного комплекса	Оптимальные pH
Aspergillus niger	Экзо-	5,2—5.6
Diplodina sp.	»	5,5—5,7
Helicola sp.	»	5,0
Penicillium claviforme	»	4,5—4,7
Trichoderma viride	Промежут.	5,4
Cercospora salina	Эндо-	3,9—4,2; 5,4—5.6
Impex lacteus	Промежут.	4,0—4,5; 5,5—5,6
Mortierella alpina	Экзо-	4,8—5,0; 6,1—6,3
Myrothecium verrucaria	»	5,4—5,5; 6,1—6.3
Trichoderma album	Промежут.	4,8—5,1; 6,1
Aspergillus oryzae	Эндо-	5,3—5,6; 6,0—6,1
Penicillium violaceum	»	5,5—5,6; 6,1
Penicillium stipitatum	Промежут.	4,7—5,0; 5,8
Rhizopus rodosus	Эндо-	4,5—4,8; 6,3—6,4
Sporotrichum pruinosum	Экзо-	4,4—4,6; 6,1—6,2

Куннингэм и Мэннерз [32] получили фермент из *Rhizopus arrhizus,* который быстро гидролизовал лихенин, запасной углевод исландских мхов, представляющий собой линейный полимер, состоящий приблизительно из 30% β-1,3 и 70% β-1,4 связей.

Гриб выращивался на среде, содержащей в 1 *л*: 2 *г* KH_2PO_4, $(NH_4)_2SO_4$ — 1,4 *г;* мочевины — 0,3 *г,* $MgSO_47H_2O$ — 0,3 *г,* $CaCl_2$ — 0,3 *г,* экстракта дрожжей (сухого) — 0,1 *г,* пептона — 1 *г,* целлобиозы — 6 *г.* Продолжительность культивирования на качалке — 7—10 дней при 27° С. Фермент получался путем добавления к культуральной жидкости, отделенной от мицелия, охлажденного ацетона (—15°).

По данным авторов, выход и ламинариназная активность, соответственно, для препаратов из фильтратов семидневной культуры составляли 1400 *мг,* 0,4 *ед/мг* из 500 *мл;* из 19-дневной культуры — 970 *мг,* 0,7 *ед/мг* из 850 *мл.* Продуктами гидролиза лихенина были ламинарибиоза и некоторые трисахариды. В работе обсуждены вопросы механизма ферментного гидролиза лихенина и его структуры.

Риис и Мендельс [105а] описали новый фермент микодекстраназу из *Asp. niger, Penicillium expansum* и других видов микроскопических грибов. Микодекстраназа является α-глюканазой, которая разрушает только α-1,4-связи в микодекстране (нигеран).

Микодекстран — полисахарид, экстрагируемый горячей водой из мицелия *Asp. niger, P. expansum* и других видов этих родов грибов; осаждается при ее охлаждении (примерно до 30° С). Он составляет иногда до 40% веса мицелия.

Авторами проверено значительное число видов *Aspergillus, Penicillium* и других грибов на активность образования микодекстрана.

При испытании 25 различных продажных ферментных полисахаридных препаратов незначительный гидролиз микодекстрана отмечен при использовании целлюлазы японского происхождения из *Trichoderma viride.*

Из 166 видов различных бактериальных культур только шесть образовывали микодекстраназу на среде с глюкозой и микодекстраном.

Продуктом гидролиза микодекстрана ферментами грибов являются тетрамер и дисахарид нигероза (α-1,3-дисахарид). При сравнительном изучении продуктов гидролиза изолихенина (α-1,3; α-1,4) и микодекстрана микодекстраназами разных видов грибов показано, что глюкоза образуется при гидролизе изолихенина, при гидролизе микодекстрана — тетрамер и дисахарид нигероза и только у отдельных видов грибов — глюкоза (рис. 16).

Наиболее специфичная микодекстраназа была у *P. melinii.* Обсуждается сравнительный механизм ферментативного гидролиза различных полисахаридов в отношении сродства отдельных ферментов к определенным участкам полимерной цепи — димерам, тетрамерам и т. д., а не только специфическим связям.

Применение целлюлаз и гемицеллюлаз микроскопических грибов относится к одной из наиболее перспективных и вместе с тем наименее разработанной области. Интенсивное изучение целлюлозолитических свойств разных видов микроскопических грибов и изолируемых препаратов целлюлаз, несомненно, является необходимой предпосылкой их будущего широкого практического использования.

Ферменты, обладающие высокой активностью разложения целлюлозосодержащих растительных субстратов, могут найти самое широкое применение.

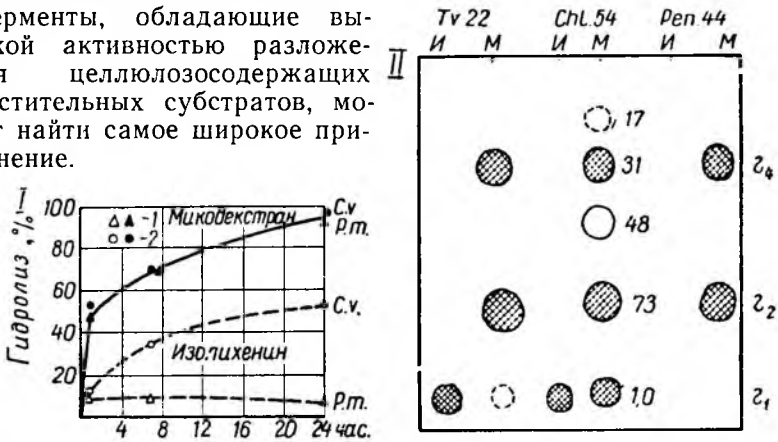


Рис. 16.

I. Сравнительный гидролиз микодекстрана и изолихенина ферментами (по Reese, Mandels): *1* — микодекстраназа (30 *ед/мл*) *Pen. melinii*; *2* — микодекстраназа (36 *ед/мл*) *Chloridium viride*. Условия: 50° С, pH 4,5, вещества 2 *мг/мл*. *C. v.*— *Chloridium viride; P. m.*— *Penicillium melinii*.

II. Продукты гидролиза изолихенина (И) и микодекстрана (М) микодекстраназами, очищенными посредством сефадекса (по Reese). Условия: гидролиз 22 *час*, вещества 1%, pH 4,5, фермента 15/*мл*; время 1—6 *час*. Растворитель изопропанол: уксусная кислота : вода (54 : 8 : 18). Проявитель: бензидин: трихлоруксусная кислота. Величина *Rf* выражена в числах. *T. v. 22*— *Trichoderma viride; Chl. 54* — *Chloridium viride; Pen. 44* — *Penicillium melinii*. r_1, r_2, r_4 — моно-, ди- и тетрасахара.

Наиболее актуальными, на наш взгляд, сейчас являются следующие области их применения.

Использование для обогащения грубых, целлюлозосодержащих кормов растворимыми, удобоусвояемыми формами углеводов, а также, возможно даже в первую очередь,— для обогащения грубых кормов белком и другими питательными веществами. Эту группу ферментов можно применить для получения глюкозы и других сахаров из различных целлюлозосодержащих и иных видов растительных отходов и сырья.

Очищенные ферменты целлюлаз могут найти применение как в медицине, так и в ветеринарии в качестве лечебных средств при определенных формах дистрофии пищеварения и для улучшения перевариваемости целлюлозосодержащей пищи и кормов.

Не менее важной областью применения целлюлаз является использование их при переработке различных видов растительных целлюлозосодержащих отходов, а также в промышленности при переработке сырья, где разрушение клеточных оболочек имеет значение для получения из клеток крахмала, сахара, масла и других веществ. Так, Веселов, Салманова и др. [3, 13] сообщают об опыте эффективного применения целлюлозолитического фермента *Trichothecium roseum* в пивоваренной промышленности при добавлении к заторам из ячменной муки.

Обширные исследования по практическому применению целлюлаз и гемицеллюлаз проведены Тояма [127—129]. В Японии организовано промышленное производство целлюлозолитических ферментных препаратов, которые применяются в отраслях промышленности, где необходимо разрушение клеточных оболочек для получения продукта (при разрушении пищевого растительного сырья и остатков, разрушении бумажных отбросов и др.). По данным автора, для промышленного получения ферментных препаратов используются культуры *Trichoderma viride* и *Aspergillus niger* на отрубях. Препарат первого гриба обладает целлюлазной и ксиланазной активностью; при разрушении фильтровальной бумаги в среде образуется до 6,6% сахаров. Препарат из *Asp. niger* имеет амилазную и целлюлазную активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атаманюк Д. Целлюлозные бактерии и грибы в почвах Молдавии.— Тр. 3 Науч. конфер. молодых ученых Молдавии. Биол. и с.-х. науки. Кишинев, 1964, 2, 121.

2. Веселов И. и др. Условия выращивания грибов с целью получения активных цитолитических культур.— Тр. Всесоюз. ин-та пивовар. пром., Технология и контроль производства, 1961, 8, 75.

3. Веселов И., Салманова Л., Шептун Л. Применение грибной цитазы в пивоварении.— Тр. Всесоюз. ин-та пивовар. пром., 1961, 8, 87.

4. Джермин М. Целлюлоза и геммицеллюлозы. Биохим. методы анализа растений. Под ред. М. Запрометова. ИЛ, М., 1960.

5. Захаров И. Развитие целлюлозных бактерий и грибов в ризосфере различных растений на карбонатном и типичном черноземах Молдавии.— Изв. АН Молд. ССР, 1962, 7, 55.

6. Имшенецкий А. Микробиология целлюлозы. Изд-во АН СССР, М., 1953.

7. Кузнецова Т. Микроорганизмы, разлагающие целлюлозу в солонцах Северной Кулунды.— Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. биол. и мед. наук, 1960, 11, 114.

8. Обозова А. Целлюлозоразлагающие микроорганизмы почв сыртов Киргизии.— Изв. Кирг. фил. Всес. о-ва почвоведов, 1962, 1, 39.

9. Очилова М. Микрофлора, разлагающая гуматы сероземных почв.— Изв. АН СССР, Сер. биол., 1961, 2, 299.

10. Перелыгин В., Федотов П. Микологическая и бактериологическая характеристика аэрозолей некоторых текстильных производств Киргизии.— Тр. Кирг. ин-та эпидемиол., микробиол. и гигиены, 1961, 5, 183.

11. Пидопличко Н. Грибная флора грубых кормов. Изд-во АН УССР, 1953.

12. Пушкинская О. О методике количественного учета микроорганизмов, способных разлагать клетчатку в почве.— Микробиология, 1954, 23, 34.

13. Салманова Л., Буканова В. Выбор эффективного продуцента цитолитических ферментов.— Тр. Центр. н.-и. ин-та пивовар., безалкогольн. и вин. пром., 1962, 9, 48.

14. Салманова Л., Горбачкова Е. Углеводный состав гидролизатов, полученных в результате действия цитолитических грибных культур на различные субстраты, там же, 1962, 9, 62.

15. Салманова Л. Способ определения активности цитолитических ферментов. Авт. свидет. № 150808, 19, 62.

15а. Хачикян Л. Распространение грибов, разлагающих клетчатку, в полупустынных, каменистых почвах.— Изв. АН АрмССР. Сер. биол., 1963, 16.

16. Basu S. N., Ghose S. The role of dark-coloured fungi in the microbiological deterioration of sun-exposed jute fabric.— Sci. Culture, 1950, 15, 285.

17. Basu S. N., Whitakes D. Inhibition and stimulation of the cellulase of *Myrothecium verrucaria*.— Arch. Biochem. Biophys., 1953, 42, 12.

18. Basu S. N., Pal P. N. An unfavourable effect of shaking on fungal cellulase.— Nature, 1956, 178, 313.

19. Basu S. N., Ghose S. N. The production of cellulase by fungi on mixed cellulosic substrates.— Canad. J. Microbiol., 1960, 6, 256.

20. Bose R., Basu S. Relation between fruiting and cellulolytic activity of *Chaetomium* sp.— Sci. Culture, 1958, 23, 378.

21. Bose R. Decomposition of cellulose by *Paecilomyces elegans* (Corda) Mason and Hughes.— Tect. J., 1962, 32, 426.

22. Buston H., Khan A. The production of β-linked glucose saccharides from cellobiose by *Chaetomium globosum*.— Biochem. Biophys. Acta, 1956, 19, 564.

23. Caldwell R. Observation on the fungal flora of decomposition beech litter in soil.— Trans. Brit. Mycol. Soc., 1963, 46, 249.

24. Carrett S. Decomposition of cellulose in soil by *Rhizoctonia solani* Kuhn.— Trans. Brit. Mycol. Soc., 1962, 45, 115.

25. Chakravarty T., Bose R., Basu S. Fungi growing on jute fabrics deteriorating under weather exposure and in storage.— Appl. Microbiol., 1962, 1u, 441.

26. Chesters C., Bull A. The enzymic degradation of laminarin. I. The distribution of laminarinase among microorganisms. 2. The multicomponent nature of fungal laminarinases.— Biochem. J., 1963, 86, 28.

27. Giligan W., Reese E. Evidence for multiple components in microbial cellulases.— Canad. J. Microbiol., 1954, 1, 90.

28. McClendon J. The action of cellulase on chromatographic on exchange celluloses. Biochem. Biophys. Acta, 1961, 48, 398.

29. Colvin J. The zise of the cellulose microfibrille.— J. Cell. Biol., 1963, 17, 105.

30. Cowling E. Structural features of cellulose that influence its susceptibility to enzymatic hydrolysis — Adv. in enzymatic hydrolysis of celluloses.— Ed. E. Reese. Pergamon Press., London—New York — Paris, Oxford, London, 1963, 1.

31. Crook E., Stone B. Enzymic hydrolysis of β-glucosides.— Biochem. J., 1957, 65, 1.

32. Cunningman W., Manners D. Studies on Carbohydrate metabolising enzymes. II. The hydrolis of lichenin by enzyme preparations from malted barley and *Rhizopus arrhizus*.— Biochem. J., 1964, 90, 596.

33. Czerwinska E., Kowalik R. Penicillia niszczace papier zabytkowy.— Acta microbiol. Polon., 1956, 5, 299.

34. Datta P., Hanson K., Whitaker D. Effects of urea on some properties of *Myrothecium* cellulase.— Biochem. Biophys. Acta, 1961, 50, 113.

35. Deese D., Stahmann M. Pectic enzymes and cellulase formation by *Fusarium oxysporum* f. *cubense* on stem tissues from resistant and susceptibility banana plants.— Phythopatology, 1962, **52**, 247.

36. Desarmenien H., Bastien C. Estimation of activity of cellulases for therapeutic uses.— Pharm. acta Helv., 1958, **33**, 583.

37. Eggins H., Pugh G. Isolation of the cellulose decomposition fungi from the soil.— Nature, 1962, **193**, 4810, 94; 116.

38. Eriksson A., Lindvall S. A new cellulase preparation from *Penicillium*.— J. Pharm. Pharmacol., 1959, **11**, 247.

39. Eriksson A. F. V., Lindvall S. J. Studies on a new cellulase preparation from *Penicillium*. I. Methods of determining enzymatic activity.— J. Pharm. Pharmacol., 1959, **11**, 747.

40. Eriksson A. F. V., Lindvall S. J. A new cellulase preparation from *Penicillium*. II. Properties and action upon different substrates.— J. Pharm. Pharmac., 1959, **11**, 756.

41. Eveleigh D. E., Brewer D. Studies on slime accumulation in pulp and paper mills. VI. Isolation of thermophilic and thermotolerant fungi from paper mills.— Canad. J. Bot., 1963, **41**, 1377.

42. Findley W., Savory J., Moder F. Die Zersetzung von Holz durch niedere Pilze.— Holzrohstaffe und Werkstoffe, 1954, **12**, 293.

43. Fukui S., Sato M. Xylanase of *Aspergillus batatae*.— Bull. Agric. Chem. Soc. (Japan), 1957, **21**, 392.

43a. Fukui S. Degradation of xylan by the xylanase system of *Aspergillus oryzae*.— J. Gen. a. Appl. Microbiol., 1958, **4**, 39.

44. Fukui S. et al. Studies on β-1, 3-xylanase. I. Existence of a new enzyme, β-1, 3-xylanase.— J. Gen. Appl. Microbiol., 1960, **6**, 270.

45. Gascoigne J., Gascoigne M. The xylanases of *Fusarium roseum*. —J. Gen. Microb., 1960, **22**, 242.

46. Golley F. An index to the rate of cellulose decomposition in the soil.— Ecology, 1960, **41**, 3, 551.

47. Göransson B., Fähraeus G. Microbiological degradation of water-soluble ethyl-hydroxethyl cellulose.— Svensk. Pappir Lidn., 1963, **66**, 19, 778.

48. Griffiths E., Jones D. Colonisation of cellulose by soil micro-organisms.— Trans. Brit. Mycol. Soc., 1963, **46**, 285.

49. Grimes R. M., Duncan G. W., Hoppert C. A. Multiplicity of cellulolytic enzymes of *Myrothecium verrucaria*.— Arch. Biochem. Biophys., 1957, **68**, 412.

50. Halliwell G. Cellulolytic preparations from microorganisms of the rumen and from *Myrothecium verrucaria*.— J. Gen. Microb., 1953, **17**, 166.

51. Halliwell G. The action of cellulolytic Enzymes from *Myrothecium verrucaria*.— Biochem. J., 1961, **79**, 185.

52. Halliwell G. The breakdown of cellulose and its derivatives by enzymes from *Myrothecium verrucaria*.— Biochem. J., 1962, **85**, 67.

53. Halliwell G. Measurement of cellulase and factors affecting its activity.— Adv. in enzym. hydrol. cell. Ed. E. Reese, Pergamon Press. London — New York—Paris, 1963, 71.

54. Hanstein E. Untersuchung über die celluloseabbauenden Enzyme von *Irpex lacteus* Fr. und *Trichoderma viride* Pers. ex. Fr.— Ber. Schweiz. bot. Ges., 1960, **70**, 315.

55. Hash J., King K. Some properties of any aryl-β-glucosidase from culture filtrates of *Myrothecium verrucaria*.— J. Biol. Chem., 1958, **232**, 395.

56. Hashimoto G., Nisizawa K. Purification of cellulase and related enzymes.— Adv. in enzym. hydrol. cell. Ed. E. Reese, Pergamon Press, London—New York—Paris, 1963, 93.

57. Husain A. Production of cellulolytic enzymes by *Sclerotium rolfsii*.— Phytopathology, 1958, **48**, 338.

58. Husain A., Rich S. Extracellular pectic and cellulolytic enzymes of *Cladosporium cucumerium*.— Phytopathology, 1958, **48**, 316.

59. Husain A., Dimond A. E. Role of cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*.— Phytopathology, 1960, **50**, 329.
60. Inaoka M., Soda H. Crystalline xylanase.— Nature, 1956, **178**, 202.
61. Ishimaru Y., Toyama N. Cellulose decomposition by *Trichoderma koningi*. I.— J. Fermentation Technol., 1952, **30**, 409.
62. Jermyn M. Fungal cellulases. I. General properties of unpurified enzyme preparation from *Aspergillus oryzae*. II. The complexity of enzymes from *Aspergillus oryzae* that split β-glucosidic linkages and their partial separation.— Austral. J. Sci. Res. Ser. B. Biol. Sci., 1952, **5**, 409, 433.
63. Jermyn M. Fungal cellulases. III. *Stachybotrys atra*: Growth and enzyme production on non-cellulosic substrates.—Austral. J. Biol. Sci., 1953, **6**, 48.
64. Jermyn A. Fungal cellulases. IV. Production and purification of an extracellular β-glucosidase of *Stachybotrys atra*.— Austral. J. Biol. Sci., 1955, **8**, 541.
65. Jermyn M. Fungal cellulases. V. Enzymatic properties of *Stachybotrys atra* β-glucosidase.— Austral. J. Biol. Sci.. 1955, **8**, 563, 577.
66. Jermyn M. Fungal cellulases. VIII. Further observation on the β-glucosidase of *Stachybotrys atra*.— Austral. J. Biol. Sci., 1958, **11**, 114.
67. Jermyn M. Some comparative properties of β-glucosidases secreted by fungi.— Austral. J. Biol. Sci., 1959, **12**, 213.
68. Khanum R., Ahmed O. Studies on the distribution, growth and cellulolytic activity of fungus organisms causing deterioration of raw and finished products.— Pakistan J. Sci. a. Ind. Res., 1958, **1**, 251.
69. King K., Smibert R. Distinctive properties of β-glucosidases and related enzymes derived from a commercial *Aspergillus niger* cellulase.— Appl. Microbiol., 1963, **11**, 315.
70. Kohlmeyer J. Über den Cellulose-Abbau durch einige phytopathogene Pilze.— Phytopathology Zs., 1956, **27**, 147.
71. Kooiman P. Some properties of cellulase of *Myrothecium verrucaria* and some fungi.— Enzymologia, 1953, **16**, 237; **18**, 371.
72. Kowalik R., Sadurska I. Microorganizmy niszczace oprawy kwiazkowe ze skory.— Acta Microbiol. Polon., 1956, **5**, 285.
73. Kowalik R., Sadurska I. Microflora niszczaca papeir Skore i pieczecia woskowe. Wystepulace w powitrzu magazynow archiwalnych.— Acta Microbiol. Polon., 1957, **5**, 277.
74. Lenbacher K., Fuiton N. *Myrothecium striatisporum*, its occurrence in Arkansas soil and its cellulolytic activity.— Mycologia, 1963, **55**, 786.
75. Li H., King K. Fractionation of β-glucosidases and related extracellular enzymes from *Aspergillus niger*.— Appl. Microbiol., 1963, **11**, 320.
76. Lyr H. Die Bildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährboden. II. Cellulose als C-Quelle.— Arch. Microbiol., 1959, 34, 189; Amylum als C-Quelle.— Arch. Microbiol., 1959, **34**, 238.
77. Lyr H. Die Buildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährboden. V. Kompliziertes Miliev als C-Quelle.— Arch. Mikrobiol., 1960, **35**, 258.
78. Lyr H. Vorkonmen und Eigenschaften von Hemicellulase bei Pilzen. Holzzerstörung durch Pilze. Berlin, 1963, **155**, 161.
79. Mandels M., Reese E. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals.— J. Bacteriol., 1957, **73**, 269.
80. Mandels M., Reese E. Induction of cellulase in fungi by cellobiose.— J. Bacteriol., 1960, **79**, 816.
81. Mandels M., Howlett W., Reese E. Natural inhibitors of cellulase.— Canad. J. Microbiol., 1961, **7**, 957.
82. Mandels M., Parrish F., Reese E. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*.— J. Bacteriol., 1962, **83**, 400.
83. Mandels M., Reese E. Inhibition of cellulases and β-glucosidases.— Adv. in enzym. hydrol. cell. Ed. E. Reese, Pergamon Press. London—New York—Paris, 1963.

84. Meyers S., Reynolds E. Growth and cellulolytic activity of lignicolous deuteromycetes from marine localities.— Canad. J. Microbiol., 1959, **5**, 493.

85. Miller G., Blum F., Resolution of fungal cellulase by zone electrophoresis.— J. Biol. Chem., 1956, **218**, 131.

86. Murti C. R., Krishna, Stone B. Fractionation of the β-glucosidases from *Aspergillus niger*.— Biochem. J., 1961, 78, 715.

87. Nisizawa K., Hashimoto I. Cellulose splitting enzymes. VI. Difference in the specificities of cellulase and β-glucosidase from *Irpex lacteus*.— Arch. Biochem. Biophys., 1959, **81**, 211.

88. Nigam S. S. et al. Microbial degradation of cotton cellulose in soil.— J. Sci. a. Ind. Res., 1960, BC 19, **1**, 20.

89. Norkraus B. Studies of β-glucosidase and cellulase splitting enzymes from *Polyporus annosus* Fr.— Phys. Plant., 1957, **10**, 198, 454.

90. Norkraus B., Wahlström L. Studies on the inhibition of cellulolytic enzymes.— Physiol. plant., 1961, **14**, 851.

91. Palding D., Bruehe G. Possible role of pectionolytic enzymes and polysaccharide in pathogenesis by *Cephalosporium gramineum* in wheat, Phytopathology, 1961, **51**, 227.

92. Porter B. et al. Effect of cellulase on cotton fiber microstructure. Pt. I. Degradation by cellulase in fungal growth filtrates. Pt. II. Degradation during growth of cellulolytic microorganisms.— Text. Res. J., 1960, **30**, 249.

93. Pozza D. Imirorganismi che possono danneggiare i tessili: mezzi per combatterli.— Fibre e colori, 1957, **7**, 91.

94. Pugh J., Blakeman J., Morgan-Jones G. Studies on fungi in coastal soils. IV. Cellulose decomposing species in sand dunes.— Mycologia, 1963, **25**, 412.

95. Raes G., Nicolaus F. Evolution de l'importance de l'attaque microbiologique du coton et mesure de la degradation.— Ann. sci. text. belg., 1959, **4**, 32; 52.

96. Ranby B. G., Norkraus B. Studies of the enzymatic degradation of cellulose.— Physiol. plant., 1956, **9**, 198.

97. Reese E., Siu R., Levinson H. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis.— J. Bacteriol., 1950, 59, 485.

98. Reese E., Gilligan W., Norrans B. Effect of cellobiose on the enzymatic hydrolysis on cellulose and its derivatives. A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms.— Physiol. plant., 1952, **5**, 345, 379.

99. Reese E., Gilligan W. Separation of components of cellulolytic systems by paper chromatography.— Arch. Biochem. Biophys., 1953, **45**, 74.

100. Reese E. Enzymatic hydrolysis of cellulose.— Appl. Microbiol., 1956, **4**, 39.

101. Reese E., Mandels M. Use of enzymes in isolation and analysis of polysaccharides.— Appl. Microbiol., 1959, **7**, 378.

102. Reese E., Mandels M. β-D-1, 3-Glucanases in fungi.— Canad. J. Microbiol., 1959, 5, 173.

103. Reese E., Parrish F., Mandels M. β-D-1, 2-Glucanases in fungi.— Canad. J. Microbiol., 1961, 7, 309.

104. Reese E., Parrish F., Mandels M. β-1, 6-Glucanases in fungi.— Canad. J. Microbiol., 1962, 8, 327.

105. Reese E. Enzymatic hydrolysis of β-glucans.— Adv. in enzym. hydrol. of cellul. Ed. Reese E., Pergamon Press, London—New York—Paris, 1963, 197.

105a. Reese E., Mandels M. A new α-glucanase, Mycodextranase.— Canad. J. Microbiol., 1964, 2, 103.

106. Røed H. Sopp eg tremasse.— Norsk skogind, 1955, 9, 123.

107. Saunders P., Siu R., Genest R. A cellulolytic enzyme preparation from *Myrothecium verrucaria*.— J. Biol. Chem., 1948, **174**, 697.

108. Selby K. The degradation of cotton cellulose by the extracellular cellulase of *Myrothecium verrucaria*.— Biochem. J., 1961, **79**, 562.
109. Selby K. The effect of cellulolytic enzymes on some properties of cotton fibers.— Adv. in enzym. hydrol. cellul. Ed. E. Reese. Pergamon Press. London—New York—Paris, 1963, 33.
110. Simpson F. Microbial pentosanases. III. Some factors affecting the production of pentosanases by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*.— Canad. J. Microbiol., 1959, **5**, 99.
111. Srensen H. Microbial decomposition of xylan.— Acta Agric. Scand., 1957, Supplement 1.
112. Stone B. Complexity of β-glucanases from *Aspergillus niger*.— Biochem. J., 1957, **66**, 193.
113. Srivastava D. N., Echandi E., Walker J. Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by *Rhyzopus stolonifera*.— Phytopathology, 1959, **49**, 145.
114. Sterson V. Die Zersetzung von Cellulose durch aerobe Microorganismen.— Zbl. Bacteriol. Abt. II, 1904, 689.
115. Strobell G. A xylanase system produced by *Diplodia viticola*.— Phytopathology, 1963, **53**, 592.
116. Strider D., Winstead N. Production of cell-wall dissolving enzymes by *Cladosporium cucumerinum* in cucumber tissue and in artifical media.— Phytopathology, 1961, **51**, 65.
117. Taha E., Abuzied A. The cellulolytic activity of the culture filtrates of Egyptain mould fungi.— Arch. Microbiol., 1962, **44**, 3, 246.
118. Taha E., Abuzied A. On the mode of action of fungal cellulases.— Arch. Microbiol., 1962, **44**, 240.
119. Taha E., Abuzied A. Precipitation and kinetics of fungal cellulases.— Arch. Microbiol., 1963, **44**, 366.
120. Talboys P. Degradation of cellulose by *Verticillium albo-atrum*.— Trans. Brit. Mycol. Soc., 1958, **41**, 242.
121. Thomas R. Fungal cellulases. VII. *Stachybotrys atra*. Production and properties of cellulolytic enzyme.— Austral. J. Biol. Sci., 1956, **9**, 159.
122. Thomas R., Whitaker D. Zone electrophoresis of *Myrothecium cellulase*.— Nature, 1958, **181**, 715.
123. Toyama N. Studies on cellulose assimilation of mould.— J. Ferm. Technol., 1952, **30**, 89.
124. Toyama N. Cellulose decomposition by *Trichoderma koningi*.— J. Fermentation Technology, 1953, **31**, 315; 1955, **33**, 406: 1956, **34**, 274, 281; 1957, **35**, 356, 363; 1958, **36**, 348, 375; 1959, **37**, 267; 1960, **38**, 83.
125. Toyama N. Cellulose decomposition by molds.— J. Ferm. Technol., 1957, **35**, 247.
126. Toyama N. A crystalline enzyme from the mold *Trichoderma koningi*.— Bull. Faculty Agric. Univ. Miyazaki, 1957, **2**, 79.
127. Toyama N. Cellulolytic activities of *Trichoderma koningi* and their application.— Bull. Agric. Univ. Miyazaki, 1958, **4**, 40.
128. Toyama N., Shibata T. Cellulase and carboxymethyl-cellulase of *Trichoderma koningi*.— J. Ferm. Technol., 1961, **39**, 262.
129. Toyama N. Degradation of foodstuffs by cellulase and related enzymes.— Adv. enzym. hydrol. cellul., Ed. E. Reese, Pergamon Press, London—New York—Paris, 1963, 235.
130. Tribe H. Aspects of decomposition of cellulose in Canadian soils. II. Nitrate nitrogen levels and carbon dioxide evolution.— Canad. J. Microbiol., 1960, **6**, 317.
131. Tribe H. Microbiological decomposition of cellulose in the soil.— Soil Sci., 1961, **92**, 61.
132. Юй Юн-нянь. Цзян-Хуэй-сю. Изучение физиологии целлюлозоразрушающего гриба *Trichoderma koningi* Oudem.— РЖБ, 1964, 29Б148. (Acta bot. sinica, 1963, 11, 191).
133. Vencata R. Studies on cellulolytic activity of Fusaria with refe-

rence to bacterial and other cellulose substrate.— Proc. Nat. Inst. Sci. India, 1957, 22, 204.
134. Vencata R. Cellulolytic activity and fungal nutrition with special reference to decomposition of bacterial cellulose by *Fusarium culmorum*.— Phytopathology, 1959, 35, 122.
135. Whistler R., Masak E. Enzymatic hydrolysis of xylan.— J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 1241.
136. Waksman S. Decomposition of cellulose and hemicelluloses by microorganisms.— In: Wood chemistry, Reinh. Publ. Corp., New York, 1944.
137. Whitaker D. Purification of the cellulase of *Myrothecium verrucaria*.— Arch. Biochem. Biophys., 1953, 43, 253.
138. Whitaker D., Colvin W. The molecular weight and shape of *Myrothecium verrucaria* cellulase.— Arch. Biochem. Biophys., 1954, 49, 257.
139. Whitaker D. The mechanism of degradation of a cellodextrin by *Myrothecium cellulase*.— Canad. J. Biochem. Physiol., 1956, 34. 488.
140. Whitaker D. The mechanism of degradation of cellulose by *Myrothecium verrucaria*.— Canad. J. Biochem. Physiol., 1957, 35, 733.
141. Whitaker D. Criteria for characterizing cellulases.— Adv. enzym. hydrol. cell. Ed. E. Reese, Pergamon Press, London—New York—Paris, 1963, 51.
142. White W. et al. Assay of cellulolytic activity of molds isolated from fabrics and related items exposed in the tropics.— Mycologia, 1949, 40, 34.
143. Weigl J. Zum Mechanismus des enzymatischen Celluloseablaus durch *Merulius lacrymans* (Wulf) Fr.— Arch. Mikrobiol., 1961, 38, 411.
144. Winstead N., McCombs C. Pectinolytic and cellulolytic production by *Pythium aphanidermatum*.— Phytopathology, 1961, 51, 270.
145. Wood R. K. S. Pectic and cellulolytic enzymes in plant diseases.— Ann. Rev. Plant. Physiol., 1960, 11, 299.
146. Wood R. K. S. Verticillium wilt of tomatoes — the role of pectic and cellulolytic enzymes.— Phytopathology, 1961, 51, 227.
147. Youatt G. Fungal cellulases. IX. Growth of *Stachybotrys atra* on cellulose and production of a β-glucosidase hydrolysing cellulobiose.— Austral. J. Biol. Sci., 1958, 11, 209.

ПЕКТИНАЗЫ

Пектиназы вызывают гидролиз пектиновых веществ. Последние представляют собой высокомолекулярные кислые полисахариды, в которых метоксилированные остатки галактуровой кислоты связаны между собой α-1,4-гликозидными связями (рис. 17).

Пектиновые вещества широко распространены в высших растениях. Они содержатся в значительном количестве в ягодах, фруктах, некоторых клубне- и корнеплодах, в стеблях растений. В растениях пектин находится в виде водонерастворимого протопектина. Протопектин — комплексное соединение пектина со сложными веществами клеточной оболочки — целлюлозой, гемицеллюлозой, арабаном, ксиланом.

Содержание протопектина и соотношение его с водорастворимым пектином в растениях колеблется в зависимости от условий. Протопектин и пектин пропитывают клеточные оболочки стеблей и плодов, корней, семян многих растений, накапливаются в клетках их плодов, образуя в комплексе с другими

полисахаридами склеивающий субстрат клеток. Созревание плодов во время вегетации растений и при хранении плодов сопровождается уменьшением содержания протопектина и увеличением содержания пектина.

Пектиновые вещества различных растений отличаются по молекулярному весу, содержанию золы, метоксильных групп, по способности к образованию гелей. Так, молекулярный вес пектина из яблок, груш, слив, сахарной свеклы равняется примерно 20 000—35 000, пектина из апельсинов — 40 000—50 000.

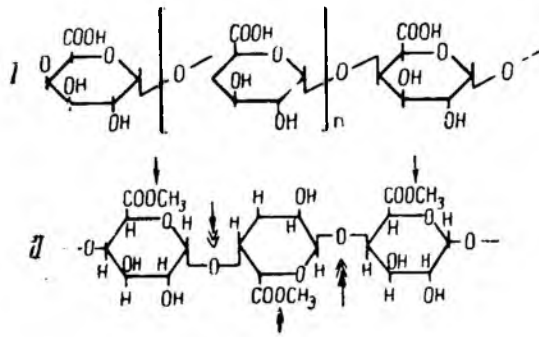


Рис. 17.

I. Строение пектиновой кислоты (по Кочеткову).
II. Действие пектинэстеразы (——→) и полигалактуроназы (→→→→) на фрагмент цепи молекулы (по Рейду).

Характерным действием пектиназ на растительные ткани является их размягчение (мацерация), распад на отдельные клетки. Обычно мацерирующее действие пектолитических ферментов устанавливается на тонких срезах тканей клубня картофеля, корня моркови и др.

Изучение гидролиза пектина ферментными препаратами из разных видов грибов, а также при различных условиях их культивирования показало, что этот процесс протекает неодинаково, что существует определенное взаимовлияние отдельных компонентов ферментного комплекса на быстроту и характер расщепления молекулы полигалактуроновой кислоты.

В основу классификации пектолитических ферментов принимают характер их действия на пектин — ферменты концевого и неупорядоченного механизма гидролиза, ферменты, гидролизующие предпочтительно пектин или пектиновую кислоту и т. п. В соответствии с характером действия фермента предложены для них названия: пектолитические ферменты с неупорядоченным механизмом действия — эндополиметилгалактуроназа; ферменты с концевым механизмом гидролиза пектина — экзополиметилгалактуроназа и т. д.

Считают, что существует две стадии гидролиза пектина: первая — быстрое расщепление молекулы (около 45—55% связей в ней); вторая — медленный процесс окончательного гидролиза, во время которого подвергаются воздействию фермента три- и дигалактуроновые кислоты, а скорость их распада равна 5% скорости расщепления пектина [7].

Установлено, например, что *Asp. faetidus* образует различного качества ферменты в зависимости от условий выращивания. Пектолитический фермент из поверхностной культуры быстро и полностью гидролизовал пектиновую кислоту до *d*-галактуроновой, а препарат из глубинной культуры гидролизовал пектиновую кислоту на 50% с образованием, главным образом, ди- и тригалактуроновых кислот.

Пектолитические ферменты различного происхождения (из грибов, дрожжей) отличаются степенью и продуктами гидролиза пектиновой кислоты.

Одним из характерных свойств пектина является образование желеподобных студней в присутствии кислот и относительно высоких концентраций сахара. Это свойство пектинов широко используется в кондитерской, фармацевтической и других видах промышленности, применяющих желатинизирующие вещества.

Ферментативный процесс гидролиза пектина широко распространен в природе — он способствует разрушению плодов и овощей при хранении, принося ущерб, а также имеет место при их созревании, разложении растительных остатков в почве, при обработке целлюлозосодержащих стеблей растений, будучи в этих случаях полезным.

Различают несколько типов ферментов, разлагающих пектиновые вещества:

Протопектиназа, или пептиндеполимераза, вызывает превращение нерастворимого протопектина в растворимый пектин. Предполагают, что под ее действием расщепляются связи между метоксилированной полигалактуроновой кислотой и арабаном; некоторые авторы отрицают наличие этого фермента.

Пектинэстеразы гидролизуют метоксильные группы молекулы растворимого пектина. В результате расщепления сложноэфирной связи образуются полигалактуроновая кислота и метиловый спирт. Активны в отношении нативного пектина. Встречаются преимущественно в высших растениях и микроорганизмах.

Пектинполигалактуроназы (пектиназы, пектингалактуроназы) гидролизуют α-1,4-глюкозидные связи пектиновой кислоты до свободных *d*-галактуроновых кислот. Встречаются главным образом у различных видов бактерий и грибов.

Саито [46] считает, что пектиновую кислоту гидролизуют два типа пектингликозидаз. Первый, вызывающий потерю вязкости растворов,— деполимерная полигалактуроназа (ДПГ) и второй, вызывающий образование редуцирующих веществ,— галактурогенная полигалактуроназа (ГПГ).

Автором изучены условия образования, методы выделения и очистки, свойства этих двух типов пектолитических ферментов у *Asp. niger.*

Гриб выращивался в погруженной культуре на среде Чапека с 3% глюкозы или лимонного пектина. Как видно из приведенного ниже рисунка (рис. 18), ДПГ образуется в более поздних фазах, при росте гриба на среде с неспецифическими источниками уг-

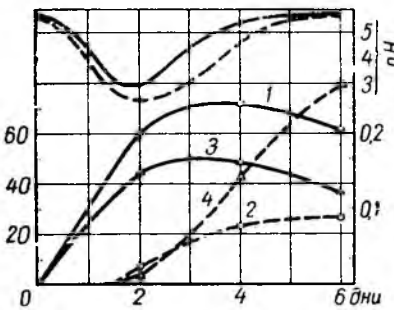


Рис. 18. Образование пектиновых гликозидаз *Aspergillus niger* в культуральной жидкости в зависимости от источника углерода (по Saito):

Образование редуцирующих сахаров: *1* — на среде с пектином или пектиновой кислотой; *2* — на среде с глюкозой или крахмалом.
Изменение вязкости субстрата: *3* — на среде с пектином или пектиновой кислотой; *4* — на среде с глюкозой или крахмалом.

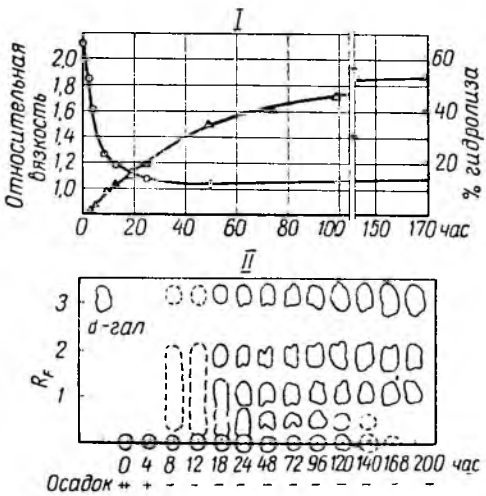


Рис. 19.

I. Гидролиз пектиновой кислоты пектингликозидазами *Asp. niger* (по Saito).
II. Бумажная хроматограмма реакционной смеси и образование осадка с H_2SO_4.

лерода. При pH среды 1,8—2,0 наибольшая активность отмечена в мицелии, а при pH 4—5 — в культуральной жидкости. ДПГ гриба быстро расщепляла полигалактуроновую цепь, уменьшая размер молекулы до три-, ди- и *d*-галактуроновой кислоты, а ГПГ — разрушала концевую часть ее цепи (рис. 19).

Подобно тому как более полный гидролиз клетчатки, крахмала совершается при воздействии на субстрат всего комплекса соответствующих ферментов, активность ферментативного расщепления пектина зависит также от действия отдельных типов пектингидролизующих ферментов.

Установлено, например, что при низкой активности пектинэстеразы или ее отсутствии пектиновая кислота значительно более устойчива к действию полигалактуроназы, чем метилированный пектин [7].

Пектинолитические ферменты различных грибов, в зависимости от условий культивирования, времени воздействия и других условий, осуществляют в различной степени гидролиз молекулы пектина, вызывая потерю вязкости раствора, образование производных пектиновой кислоты с различным молекулярным весом.

Характерными показателями действия пектолитических ферментов являются: 1) потеря вязкости пектиновых растворов; 2) потеря способности растворов пектина к образованию геля при добавлении этанола или растворов кальциевых солей; 3) повышение титруемой кислотности растворов вследствие деметилирования пектина и освобождения полигалактуроновой кислоты; 4) повышение содержания редуцирующих веществ в растворе.

Полигалактуроновая, или пектиновая, кислота характеризуется способностью легко образовывать соли и осаждаться из растворов в виде пектата кальция, что служит основой для метода количественного определения пектиновых веществ.

Описано значительное число видов микроскопических грибов — продуцентов пектолитических ферментов. Изучение их в этом отношении проводилось в трех основных направлениях: исследовались виды, поражающие плоды и фрукты во время хранения и переработки, виды — активные продуценты пектиназ (с целью использования их в промышленности) и виды, поражающие растения во время вегетации.

В обзоре Деуэла и Штутца [24], посвященном пектиновым веществам и пектиновым ферментам, микроскопические грибы разбиваются на группы, характеризующиеся определенным типом полигалактуроназы:

I тип. Вызывает значительное снижение вязкости пектиновых растворов и незначительное повышение уровня редуцирующих веществ в начальной стадии гидролиза пектина. Отмечен у *Asp. aureus, Asp. faetidus, Asp. niger, Ceratostomella ulmi, Fus. moniliforme, Neurospora crassa, Pen. expansum, Rh. tritici, Verticillium dehliae.* В последующих стадиях гидролиза пектина ферментами этого типа могут образовываться олиго- и моногалактуроновые кислоты, для разных видов грибов-продуцентов неодинаковые.

II тип. Более активно гидролизует высоко эстерифицированные пектины, чем низко эстерифицированные. Отмечен у *Asp. niger, Botrytis cinerea, Pythium debarianum.*

III тип. Сахарогенная полигалактуроназа. Отмечена у *Asp. faetidus, Asp. niger, Sclerotinia libertiana.*

В зависимости от условий культивирования, способов выделения и очистки у одного вида представляется возможным установить наличие определенного комплекса пектолитических ферментов.

Изучение ферментативного гидролиза пектина с применением методов хроматографии, фракционированного осаждения, адсорбции и др. позволяет установить различия в свойствах пектолитических ферментов отдельных видов грибов.

Джермин и Томкинс [37], используя метод бумажной хроматографии, изучили характер гидролиза и промежуточные про-

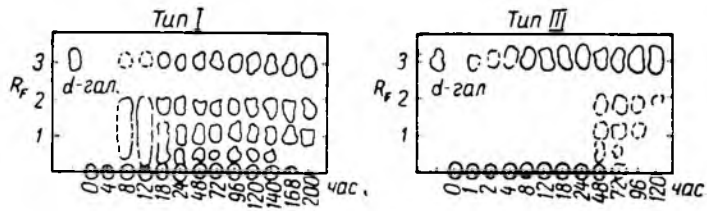


Рис. 20. Механизм действия I и III типов полигалактуроназ из *Asp. niger* на пектиновую кислоту в течение ее гидролиза (по Deuel, Stutz).

дукты, образуемые при гидролизе пектиновой кислоты ферментами *Botrytis cinerea, Pen. expansum, Asp. aureus.*

В опытах авторов были ферментные препараты из культур грибов на отрубях, получаемые экстрагированием сухой культуры дистиллированной водой (1/10) при pH 5,6, с последующим осаждением 95%-ным этанолом (пятикратным объемом) или сульфатом аммония (70 *г*/100 *мл* экстракта). В качестве субстрата использовалась натриевая соль лимонного пектина. 1%-ный раствор пектина смешивали с раствором фермента до концентрации 0,85% пектина в растворе; смесь выдерживали при 20° С и образцы для исследования брали через 15, 30 *мин*, 1 *час*, 1,5, 2,5, 4,6, 8, 24, 48, 73, 96 *час*. Определялись способность раствора к образованию гелей с этанолом и $CaCl_2$, уровень образования редуцирующих веществ (йодно-редуцирующая проба) и проводилось хроматографирование раствора.

Пектиназа изучаемых видов грибов вызывала активный гидролиз пектина, выражающийся в резком повышении уровня редуцирующей способности пектинового раствора, потере его вязкости. В качестве продуктов гидролиза пектина образуются олигогалактуроновокислые сахариды и фрагменты молекулы пектина, которые проявляют подвижность и обнаруживаются хроматографией в разные периоды времени (рис. 21). Обнаружение хроматографией этих соединений становится возможным при разрушении около 30% гликозидных связей молекулы по-

лигалактуроновой кислоты. Изменения характерных свойств пектина — образование геля с этанолом или $CaCl_2$, потеря вязкости раствора совпадают со степенью гидролиза молекулы до фрагментов с пятью или менее единицами галактуроновой кислоты, обнаруживаемых на хроматограмме.

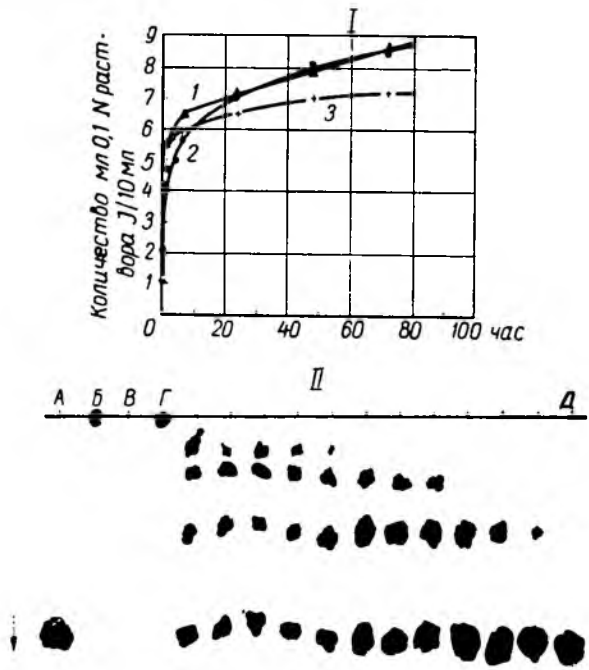


Рис. 21.

I. Пектиназы разных видов грибов (по Jermyn, Tomkins). Изменение йодо-восстанавливающего уровня раствора под влиянием пектиназы *Botrytis cinerea (1), Penicillium expansum* (2), *Asp. aureus* (3).
II. Гидролиз пектина под влиянием препарата пектиназы из *B. cinerea: А* — пятно галактуроновой кислоты; *Б* — раствор пектина; *В* — раствор фермента; *Г—Д* — смесь раствора пектина и фермента в различные промежутки времени: 0,25; 0,05; 1; 1,5; 2,5; 4; 6; 8; 24; 48; 73; 96 *час* после начала гидролиза.

При изучении продуктов гидролиза пектина ферментами из *Neurospora crassa* отмечено, что пектиназа этого вида отличается рядом свойств от пектолитических ферментов других видов грибов [45]. При потере вязкости раствора под воздействием пектиназы из *Neurospora crassa* на 50% отмечено только 2% гидролиза пектина, определяемого по повышению содержания редуцирующих веществ. В течение 1 *час* реакции отмечена потеря до 90% вязкости раствора в реакционной смеси и до 30% разложения пектина.

Конечными продуктами гидролиза пектина пектиназой *N. crassa* являются преимущественно полиурониды низкого молекулярного веса (до 4000).

Ферментативное разрушение пектиновых веществ в растениях имеет значение в патогенезе некоторых их заболеваний, а также при разрушении пектиновых веществ листьев и иногда плодов растений и освобождении фитопатогенных вирусов.

Выделяемые фитопатогенными грибами пектолитические ферменты могут разрушать пектин средней пластинки и пектаты в первичных клеточных оболочках, что приводит к изменению их физико-химических свойств и создает благоприятные условия для внедрения патогенного гриба.

Эйшоур [14] изучил пектинолитическую активность культуральной жидкости и мицелия *Botrytis cinerea* и *Pythium de-Barianum* в зависимости от источников углерода, азота и некоторых минеральных веществ. Автор показал, что пектиназа *B. cinerea* имеет оптимум действия при pH 4—5,0, а *P. de-Barianum* — 8—9,0. В зависимости от условий культивирования и биологических свойств изучаемых грибов меняется соотношение между образованием пектиназ в мицелии и культуральной жидкости.

Уаэринга [58], изучая пектинразлагающие грибы из растительных остатков леса — опавших листьев и т. д., установил, что преобладающими здесь были грибы рода *Cladosporium.*

Рэджгэб и Фэбиэн [44] определяли пектолитическую активность разных грибов, выделенных из томатов, при разных pH среды (2,0; 3,0; 4,5; 6,0; 7,0; 10,8). При pH 2,0 и 10,8 роста грибов не отмечено. Не установлено прямой зависимости между интенсивностью роста и пектолитической активностью у *Asp. niger, Asp. terreus, Asp. clavatus, Botrytis cinerea, Colletotrichum phomoides, Fus. oxysporum, Mucor globosus* и др.; у ряда других видов, как например *Mucor hiemalis, Oospora* sp., *Pen. purpurogenum*, снижение интенсивности роста мицелия сопровождалось уменьшением пектолитической активности.

Активная пектинметилэстераза обнаружена в автолизате культуры *Sclerotinia sclerotiorum* [25], в то время как в культуральной жидкости преобладала полигалактуроназа. Показано, что соки растений, чувствительных к поражению гриба, в меньшей степени ингибируют пектиназы *Scl. sclerotiorum*, чем соки устойчивых к грибу растений.

Хусейн и Райх [34, 36] установили, что *Cladosporium cucumerinum* образует в культуральной жидкости из среды Чапека с глюкозой только полигалактуроназу.

Гупта и Пандей [28] изучали активность пектиназ *Rhizopus stoloniferum* при росте на разных средах и экстрактах из зараженных грибом плодов яблок, абрикосов, персика и др.

Клендон и др. [20] из яблок, пораженных *Botryosphaeria ribis*, получили активные препараты пектолитических ферментов. В опытах авторов была изучена пектолитическая активность в отжатом соке яблок и мязге.

Ряд работ посвящен изучению роли пектолитических ферментов в патогенезе фузариозного увядания различных растений. Так, Уэйггонер и Даймон [57] предполагают, что пектинэстераза, образуемая грибом в пораженном растении, может превращать пектиновые вещества при углублениях в стенки сосудов в субстраты для пектингалактуроназы. В результате действия последней могут образовываться полигалактурониды, которые дают сильно вязкие гели, способные закупоривать сосуды. Закупорка сосудов приводит к снижению поступления воды к листьям и вызывает симптомы увядания.

Сравнительное изучение пектолитической активности двух форм *Fus. oxysporum — F. oxysporum* f. *conglutinans,* вызывающей увядание капусты (пожелтение), и *F. oxysporum* f. *lycopersici,* вызывающей увядание томатов [32], показало, что последняя обладает значительно большей активностью пектинэстеразы и полигалактуроназы. В то же время *F. oxysporum* f. *conglutinans* при росте на пшеничных отрубях образовывал фермент, гидролизующий пектат до галактуроновой кислоты (табл. 19).

Авторы считают, что низкая активность пектиндеполимеразы и высокая активность полигалактуроназы может быть при-

Таблица 19

Активность пектолитических ферментов в фильтратах культур *F. oxysporum* f. *lycopersici* и *F. oxysporum* f. *conglutinans*, выращенных на различных средах

Субстрат	Пектиндеполимеразная активность*	Пектинэстеразная активность**	Полигалактуроназная активность***
	F. oxysporum f. lycopersici		
Пшеничные отруби . .	60,5	16,3	29,6
Стебли томатов . . .	91,0	9,5	—
Стебли капусты . . .	95,2	18,4	—
	F. oxysporum f. *conglutinans*		
Пшеничные отруби . .	10,7	8,6	31,6
Стебли томатов . . .	35,1	1,5	—
Стебли капусты . . .	6,7	6,5	—

* Деполимеразная активность определялась как процент снижения вязкости раствора пектата натрия за 2 *час.*

** Пектинэстеразная активность — степень освобожденных OCH_3-групп пектинового раствора за 3 *час.*

*** Полигалактуроназная активность — уровень редуцирующей способности раствора за 6 *час.*

чиной заболевания капусты фузариозным увяданием (пожелтением и хлорозом жилок листа, побурением сосудов).

Активность пектолитических ферментов определялась также и хроматографическим изучением продуктов гидролиза пектина. Хроматографическое определение галактуроновой кислоты проводилось в системе растворителей — бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 5).

В опытах Трайона [54] по изучению пектолитической активности патогенного моноспорового изолята *Fus. oxysporum* f. *lini* гриб культивировался поверхностным способом на минеральной среде с микроэлементами и 12,5 *г* сахарозы, 12,5 *г* лимонного пектина, 3 *г* дрожжевого экстракта и 3 *г* бактопептона в 1 *л* воды. Фильтраты гриба почти не проявляли пектинэстеразной активности, но полигалактуроназная их активность была очень высока: через 10 *мин* инкубации отмечено значительное снижение вязкости раствора (рис. 22), а через 8 *час* инкубации хроматографически обнаружена галактуроновая кислота. Показано, что высокая полигалактуроназная активность является характерным свойством данного штамма.

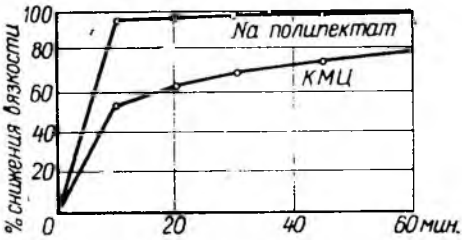


Рис. 22. Сравнительный коэффициент снижения вязкости полипектата натрия и карбоксиметилцеллюлозы ферментами, продуцируемыми *Fus. oxysporum* f. *lini* (по Trione).

Даннелл [23] установил высокую пектинэстеразную активность штаммов *Fus. oxysporum* f. *lycopersici*, отличающихся патогенными свойствами. Активность пектинэстеразы и полигалактуроназы определялась на агаризованном субстрате по образованию зон просветления после обработки метил красным и 5-н. соляной кислотой. Взятые штаммы не обладали полигалактуроназной активностью.

Манн [40б] провел сравнительные исследования вирулентного штамма *F. oxysporum* f. *lycopersici* и полученных из него мутантов, не образующих или слабо образующих пектинолитические ферменты.

Пектолитическая активность фильтратов определялась чашечным методом. Для установления пектинэстеразной активности среда содержала 1% очищенного пектина, 0,01% салициланилида, метиловую красную и 2% агара в дистиллированной воде, pH субстрата и фильтрата доводился NaOH до 6,0. Активность определялась по образованию зон красного цвета вокруг цилиндров с фильтратами после инкубации в течение 16 *час* при 25° С.

Полигалактуроназную активность определяли на среде с 0,7% очищенного полипектата натрия в 0,2 М ацетатном буфере при pH 5,0. При обрызгивании чашек 5-н. HCl вокруг цилиндриков образовывались зоны просветления различного диаметра.

Четкой зависимости между активностью образования пектиназ и вирулентностью изучаемых штаммов не отмечено. Автор предполагает, что пектиназы *Fus. oxysporum* f. *lycopersici* могут играть роль на определенных стадиях развития заболевания, когда гриб проникает в сосудистую систему через корни.

При изучении пектолитических свойств *Fus. oxysporum* f. *cubense*, вызывающего увядание бананов [22], было установлено, что культура гриба, предварительно адаптированная к биосинтезу пектолитических ферментов культивированием на среде Чапека с 0,5%-ным пектином, обладала значительно большей активностью полигалактуроназы (табл. 20).

Таблица 20

Образование пектиновых ферментов *Fus. oxysporum* f. *cubense*, выращенного на глюкозе, пектине или пшеничных отрубях при 28° С в течение семи дней

Источники углерода в среде	Пектиндеполимераза	Пектинметилэстераза
Глюкоза, 1%	3	2
Глюкоза+0,1% пектина . .	6	2
Пектин, 1%	42	50
Пшеничные отруби	7	2

При росте преадаптированной культуры гриба на тканях чувствительного сорта банана активность образования пектолитических ферментов была значительно выше, чем на тканях устойчивого. Максимальная активность пектинэстеразы приводит к образованию пектиновой кислоты, снижению pH и повышению полигалактуроназной активности гриба.

Авторы считают, что пектинэстераза, разрушая пектин в первичных оболочках клетки и пектаты в срединной пластинке чувствительного сорта, приводит к образованию крупных фрагментов молекулы пектинов, которые могут давать с ионами Ca и Mg пектиновые гели, закупоривающие сосуды. В устойчивом сорте образуются высокоактивные хиноны, угнетающие синтез грибом гидролитических ферментов. С биохимической стороны восприимчивость растений к заболеванию связана с активностью гидролитических ферментов гриба и его обильным ростом в тканях растения, а устойчивость сопровождается угнетением или подавлением гидролитических ферментов и ограничением роста гриба в ткани растения.

Уайнсмид и Камбз [60, 61] установили, что пектолитические ферменты гриба *Pythium aphanidermatum*, вызывающего гниль огурцов, отличаются по некоторым свойствам от пектиназ других видов этого рода — *P. de-Barianum, P. irregulare.*

Гриб выращивали на среде, содержащей 3 *г* KH_2PO_4, 2 *г* K_2HPO_4, 0,5 *г* $MgSO_4$, 2 *г* аспарагина в 1 *л* среды. Источники углерода — глюкоза, лимонный пектин, полипектат натрия, pH 6,0. Гриб рос в стационарной культуре; активность пектолитических ферментов определяли на третий, седьмой, 14-й день роста при разных значениях pH. Активность пектинметилэстеразы определяли по изменению реакции среды с бромтимолбляу (появление желтой окраски при подкислении среды), пектингалактуроназы — по потере вязкости 1,2%-ного пектата натрия и лимонного пектина, а также хроматографированием продуктов гидролиза (одномерная нисходящая хроматограмма в смеси бутанол : вода (1250 : 84) и пропионовая кислота : вода (587 : 747).

Рост гриба на средах с пектином или полипектатом натрия был слабый, а на стерильных тканях огурцов — очень обильный. В фильтратах культур гриба на этих средах не установлена пектинметилэстераза, а экстракты из зараженных грибом и здоровых тканей огурца обладали пектинметилэстеразной активностью. Полигалактуроназа гриба была активна в отношении полипектата натрия, а не пектина. Наибольшая активность полигалактуроназы отмечена в экстрактах из тканей больных огурцов на четвертый день после заражения.

Пектолитические свойства другого вида гриба, поражающего огурцы,— *Cladosporium cucumerinum* исследовали Штрайдер и Вайнслид [53а]. Гриб выращивался на среде Ричардса при pH 4,5, с 2% различных источников углерода. Активность пектолитических ферментов определялась по потере вязкости растворов пектина и пектата натрия.

В зависимости от источника углерода активность пектолитических ферментов гриба различна (табл. 21).

Наиболее обильный рост гриба отмечен на среде с полипектатом натрия. В экстракте из больных тканей огурца выявлена низкая активность полиметилгалактуроназы.

Туттобелло и Милл [55] изучили пектолитическую активность штаммов *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Sclerotinia, Mucor,* выделенных из различных источников, особенно овощей и фруктов. Для первичного отбора грибы культивировались на среде Чапека с 2% яблочного пектина.

Отбор активных штаммов проводился по потере вязкости и степени просветления 5%-ного раствора пектина под воздействием фильтратов грибов. Подробно изучены условия образования пектолитических ферментов, их выделение и очистка у наиболее активного штамма *Asp. niger.*

Таблица 21

Влияние источников углерода в среде на активность пектолитических ферментов в фильтратах семидневных культур *Cladosporium cucumerinum*

Источник углерода в среде	Процент потери вязкости раствора		
	лимонного пектина	полипектата натрия	карбоксиметилцеллюлозы
Полипектат натрия	30	27	90
Декстроза	15	30	11
Сахароза	16	16	44
Лимонный пектин	95	92	0
Галактуроновая кислота	—	—	7
Целлобиоза	6	14	0
Карбоксиметилцеллюлоза	0	0	30
Фильтровальная бумага	0	0	30
0,1% дрожжевого экстракта	0	0	0
Целлюлоза	—	—	82
Пектин	72	95	—

Гриб выращивали поверхностным и глубинным методами на протяжении, соответственно, пяти и семи дней, при 30° С. Опыты проведены на синтетических средах (основа Чапека), а также на отварах гороха, сои, кукурузы, мясном бульоне (pH около 4,0). Для производственного получения пектинолитических ферментов из *Asp. niger* авторами рекомендована среда следующего состава: 0,05% Na_2SO_4; 0,2% NH_4NO_3; 2% сахарозы; 2% пектина в отваре гороховой муки. Ферментация пять-шесть дней, при 30° С; pH 3,0—4,0.

Типичная направленность процессов метаболизма гриба при ферментации показана на рис. 23, из которого видно, что нарастание пектолитической активности сопровождается использованием сахарозы, накоплением биомассы мицелия и снижением pH среды. Осажденные этанолом препараты обладают высокой пектиназной активностью и гомогенны на бумажном электрофорезе при pH 7,2 и 8,0. Фермент быстро снижает вязкость раствора пектина, но не осуществляет его полного гидролиза. Тетрагалактуроновая кислота активно превращалась в три- и моногалактуроновые кислоты; тригалактуроновая слабо превращалась в ди- и моногалактуроновые, а дигалактуроновая кислота не разрушалась под воздействием фермента *Asp. niger*.

Исследование пектолитических свойств штаммов *Pellicularia filamentosa*, выделенных из больных растений бобов, картофеля, капусты [17], показало, что все штаммы обладали в различной степени пектинэстеразной и полигалактуроназной

активностью. Проведено сравнительное изучение пектиназной активности патогенного и непатогенного штаммов.

Грибы культивировались погруженным методом на среде Чапека с 1% пектина в течение трех дней. Установлено оптимальное значение pH для пектолитических ферментов этих штаммов и быстрота разложения пектина и пектата (рис. 24).

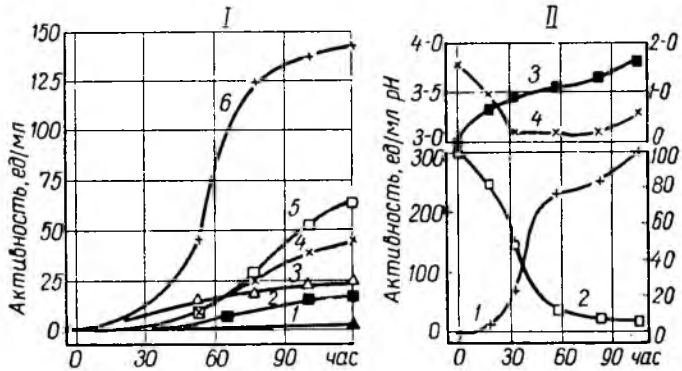


Рис. 23. Пектиназа *Asp. niger* (по Tuttobello, Mill):

I. Влияние состава среды на пектолитическую активность: *1* — Чапек — Докс (2% сахарозы + 2% пектина); *2* — 2%-ный кукурузный экстракт; *3* — 2%-ный экстракт из муки сои; *4* — 2%-ный экстракт из муки земляного ореха; *5* — мясной бульон (1% мясного экстракта + + 1% пептона); *6* — экстракт из муки земляного ореха.
II. Изменение физиологических процессов при образовании пектиназы при глубинной ферментации *Asp. niger: 1* — пектолитическая активность; *2* — концентрация сахарозы; *3* — вес мицелия; *4* — pH.

Оптимальное pH полигалактуроназы патогенного (№ 29) и непатогенного (№ 24) штаммов равно 4,0, для пектинэстеразы — 7,0.

Активность пектолитических ферментов значительно выше у патогенного штамма *P. filamentosa*, особенно в отношении гидролиза пектата.

Полигалактуроназа в культуральной жидкости разлагает полипектат натрия до галактуроновой кислоты через 48 *час*, а экстракт зараженного растения не разлагает даже спустя 96 *час* после начала реакции.

Полигалактуроназа из культуральной жидкости гриба более термостабильна при pH 5—8, в то время как фермент из зараженных грибом тканей более стабилен при pH 3—4.

Автор вполне справедливо указывает, что условия культивирования гриба влияют на характер образующихся ферментов и что данные, получаемые в опытах *in vitro*, нельзя непосредственно использовать для суждения о процессах, происходящих в больном растении. Он считает, что, по-видимому, повышение активности пектинэстеразы в зараженных грибом

тканях происходит частично за счет фермента, образуемого в растении грибом.

Шпелдинг и соавторы [50, 51] показали, что *Cephalosporium gramineum* — возбудитель полосатости листьев озимой пшеницы — образует полигалактуроназу, пектинэстеразу. Отмечена некоторая взаимосвязь между наличием и активностью полигалактуроназы, а также токсическим действием полисахаридов гриба и чувствительностью сортов к заболеванию.

В опытах авторов гриб выращивался поверхностно на среде Ричардса (1 *г* KNO_3; 2,5 *г* KH_2PO_4; 2,5 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 *г* $FeCl_3$; 5 *г* сахарозы в 1 *л* дистиллированной воды) в течение трех недель. Полигалактуроназа *Cephalosporium gramineum* наиболее активно образовывалась в культуральной жидкости при pH 5,4; инактивируется при 66—70° С.

Гамильтон и Джонсон [31], изучая пектолитическую активность микроорганизмов, вызывающих размягчение огурцов при засоле, из 56 выделенных культур грибов высокую активность полигалактуроназы отметили у видов *Alternaria, Asp. niger, Asp. sydowii, Asp. fumigatus, Monilia, Fus. nivale* и др.

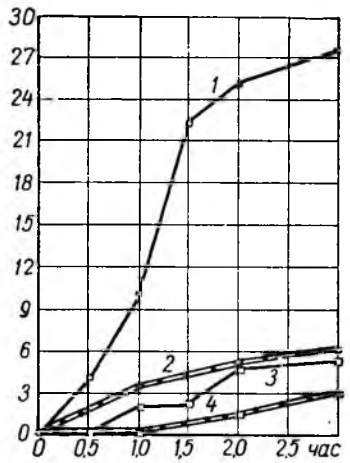


Рис. 24. Скорость гидролиза пектиназой пектата (*1*) и пектина (*2*) патогенного штамма (№ 29) *Pellicularia filamentosa* и непатогенного штамма (№ 24) пектата (*3*) и пектина (*4*) (по Berker, Walker).

Соммер, Криз и соавторы [49] показали, что спорангиоспоры *Rhizopus stoloniferum,* вызывающего поражение и мацерацию тканей плодов и фруктов при созревании и хранении, после их облучения гамма-лучами обладают способностью обильно синтезировать пектолитические ферменты. В то же время прорастание их и рост были задержаны. Спорангиоспоры после гамма-облучения, как и необлученный мицелий и споры *Rh. stoloniferum*, активно образовывали только пектинэстеразу.

Была также установлена [52] способность *Rh. stoloniferum* образовывать пектиназу и целлюлазу. При росте гриба на минеральной среде с пектином последний быстро гидролизуется, а при росте его на среде с пектином и полипептатом образуется также целлюлаза. Оптимум pH для ее действия равен 4,8; фермент устойчив к подогреванию до 55° С в течение 10 *мин.* При этой температуре полностью разрушается полиметилгалактуроназа гриба.

В опытах Ноур и др. [41], изучавших пектолитические ферменты расы *Rhizoctonia solani* из томатов, гриб выращивался на среде Чапек—Докса с пектином как источником углерода. Максимальная активность образования пектиназ отмечена на седьмой день роста гриба. Изучены условия максимальной активности концентрированных пектиназ (pH 6,0; температура 35° С).

Активность пектиназы у *Rh. solani* исследовал Бэйтимен [15, 16] при выращивании гриба на разных средах и экстракте из пораженной ткани (гипокотиле) фасоли.

Гриб выращивали на синтетической (0,5 *г* $MgSO_4$, 1,0 *г* KH_2PO_4, 0,9 *г* $CaCl_2$, 0,01 *г* $FeCl_3$, 1,17 *г* аспарагината натрия, 50 *г* тиамина, 20 *г* декстрозы или пектина на 1 *л*) и картофельно-декстрозной среде, а также экстракте из пораженных грибом свежих проростков фасоли. Продолжительность выращивания — пять дней при 30° С. После этого жидкость отделяли центрифугированием от мицелия, фильтраты диализовали через целлофановый фильтр против дистиллированной или деминерализованной воды. Активность полигалактуроназы определяли по снижению вязкости 1,2% полипектата натрия или пектина, а также образованием редуцирующих веществ.

Установлено, что водные экстракты из пораженной ткани содержат полигалактуроназу и смесь пектинметилэстераз, которые отличаются от пектиназ, образуемых при выращивании гриба на экстрактах пораженных тканей (рис. 25). Образование редуцирующих веществ было почти в 40 раз больше у препаратов из фильтратов гриба, чем из экстрактов пораженного растения.

Полигалактуроназа из больных тканей превращала пектин только до трех более низкомолекулярных полимеров, а из фильтратов — до галактуроновой кислоты. Полигалактуроназы из этих двух источников отличались также по отношению к pH, температуре инактивации и ряду других факторов. В то же время по степени снижения вязкости раствора отличий не отмечено. Оба фермента снижали до 80% вязкость раствора полипектата натрия после 30 *мин* реакции.

Гейдли и Байрамбелан [30] отметили высокую пектинолитическую активность рас *Rh. solani*, патогенных для картофеля, риса, и рас, являющихся симбионтами орхидных.

Применение пектиназ. Пектинолитические ферменты могут быть применены в тех случаях, когда требуется разрушение растительных тканей, освобождение клеток или изменение структуры их клеточных оболочек.

Они снижают вязкость и облегчают фильтрование и концентрацию фруктовых и плодоягодных соков. Наиболее широко в настоящее время пектиназы используются в промышленности, изготовляющей натуральные соки и фруктовые напитки.

Пектолитические ферменты в этой области применяются в двух направлениях: обработка фруктовой или плодоягодной мязги с целью разрушения тканей и улучшения выхода сока и обработка фруктовых соков для удаления пектиновых веществ в них и их просветления.

В связи с различным составом и свойствами пектиновых веществ разных растений, а также ферментативными свойствами препаратов пектиназ различного происхождения успех ис-

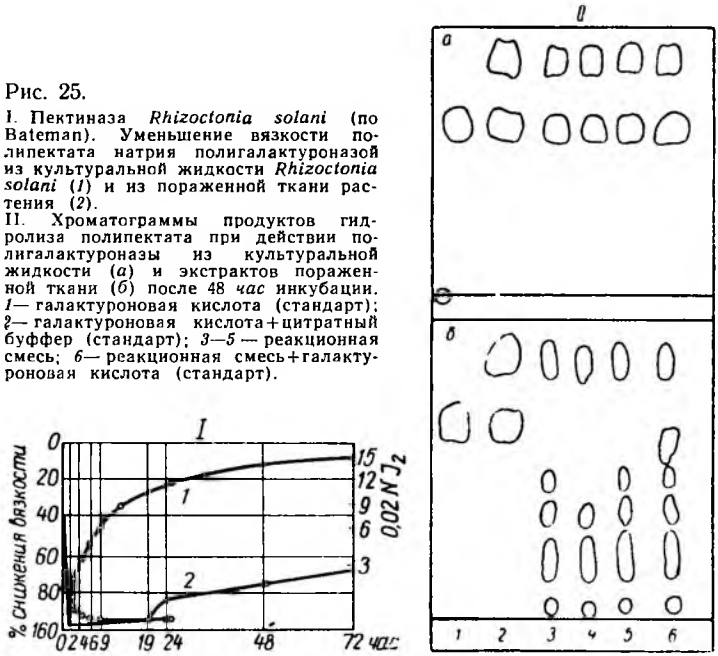


Рис. 25.

I. Пектиназа *Rhizoctonia solani* (по Bateman). Уменьшение вязкости полипектата натрия полигалактуроназой из культуральной жидкости *Rhizoctonia solani* (*1*) и из пораженной ткани растения (*2*).

II. Хроматограммы продуктов гидролиза полипектата при действии полигалактуроназы из культуральной жидкости (*а*) и экстрактов пораженной ткани (*б*) после 48 *час* инкубации. *1*— галактуроновая кислота (стандарт); *2*— галактуроновая кислота+цитратный буффер (стандарт); *3—5* — реакционная смесь; *6*— реакционная смесь+галактуроновая кислота (стандарт).

пользования их в значительной мере обусловлен правильным подбором препаратов для определенных целей гидролиза пектина.

В некоторых видах производства соков требуется быстрое подавление действия пектиназ. Так, при изготовлении лимонного сока незамедлительно после отжатия необходима пастеризация его для разрушения пектиназ тканей лимона. Некоторые препараты пектиназ, например из *Asp. faetidus*, обладая высокой активностью гидролиза пектина и пектиновых кислот, являются неактивными по отношению к определенным природным пектинам, а препараты пектиназы из *Asp. niger* и ряда видов дрожжей активны в отношении природного пектина.

При использовании определенного пектолитического фермента следует также учитывать наличие и характер пектиназ в обрабатываемых растительных тканях, необходимо создать

условия для применяемого фермента пектиназы, чтобы ее действие дополняло активность пектолитических ферментов обрабатываемого растительного сырья [7, 12]. Качество сырья оказывает также влияние на активность пектиназ при обработке мязги и соков. Так, в соке незрелой черной смородины содержатся вещества, оказывающие ингибирующее действие на активность пектинэстеразы.

Нельзя не согласиться с мнением Рейд о том, что сложность процессов ферментативного гидролиза полисахаридов, в частности пектиновых веществ различного происхождения, выдвигает необходимость изучения максимальной активности применяемых пектолитических ферментов в конкретных условиях их предполагаемого промышленного применения.

До недавнего времени пектиназы применялись в виде сухой культуры гриба на отрубях, однако в последние годы проводится расширенное изучение способов применения взамен их очищенных препаратов пектиназы. Последние представляют собой порошок, осажденный растворителями из водного экстракта культуры гриба на отрубях. Обычно такие препараты представляют смесь нескольких ферментов — амилаз, протеаз, а также комплекса пектолитических ферментов. Вполне очевидно, что пользование ими нередко не сопровождается ожидаемым эффектом и затрудняет контроль их качества. Очищенные ферментные препараты пектиназ, получаемые при выращивании определенных видов грибов в строго контролируемых условиях среды, еще не нашли широкого производственного применения.

Активные пектиназы при получении соков из яблок, груш, цитрусовых, как сообщает Чарли [12], обычно применяются при последующем осветлении их после отжатия из мязги. При получении же соков из мягких фруктов — клубники, малины и др. отжим мязги и фильтрация соков значительно улучшаются после полного гидролиза пектина в мязге, достигаемого добавлением активных пектиназ. Автор указывает, что применяемые в производственных условиях в Англии пектолитические препараты вызывают полное расщепление пектина в мязге при 55° С за 1—2 *час.*

Эффективность применения пектолитических ферментов при производстве фруктовых соков зависит от ряда факторов. Степень гидролиза пектина определяется в значительной степени характером термической обработки сырья и готовых изделий. Так, для полного расщепления пектина применяется кратковременное подогревание мязги до 80° С с последующим охлаждением ее перед добавлением ферментов до 45—55° С. Но при такой обработке разрушается присутствующая в сырье пектинэстераза, обусловливающая эффективность препаратов пектиназ с высокой полигалактуроназной активностью.

Кроме создания определенного температурного режима, в технологии изготовления фруктовых соков при применении пектолитических ферментов имеют значение свойства используемых препаратов пектиназ, характеристика и наличие пектолитических ферментов в различных видах перерабатываемых плодов и ягод. Присутствие пектинэстеразы в мязге черной смородины, например, характеризующейся высоким содержанием пектиновых веществ, весьма необходимо для полного гидролиза пектина препаратами полигалактуроназы. Наоборот, сохранение пектина в лимонном соке, предназначенном для изготовления фруктовых напитков, является необходимым, и в этом случае производят инактивирование пектолитических ферментов плодов в мязге.

Как уже отмечалось, пектиновые вещества и пектиназы разных растений отличаются некоторыми свойствами; отличаются они также в фруктах, плодах, ягодах в зависимости от степени зрелости последних. Как указывает Чарли, для наиболее эффективного применения пектиназ при переработке различных фруктов, ягод необходимо вести одновременный контроль активности применяемых ферментов и пектиназ, содержащихся в используемом сырье. В зависимости от получаемого продукта при переработке фруктовой и плодовой мязги, контролируемая в производственных условиях конечная степень гидролиза пектиновых веществ различна. В ряде случаев изготовляемый продукт должен иметь некоторую степень мутности или вязкости, т. е. содержать определенное количество негидролизованного пектина.

Предполагают, что пектолитические ферменты, как содержащиеся в дрожжах, так и вносимые при производстве виноградного сусла, имеют значение в производстве и созревании вин.

Отмечено эффективное применение очищенных препаратов пектиназы из *Asp. niger* для обработки плодово-ягодной мязги при получении соков [4]. Пектолитический препарат получен Кувиковой из культуры *Asp. niger* на отрубях с добавлением к ним 1,5—2% очищенного пектина подсолнечника или из отходов промышленности, богатых пектином,— свекловичного жома, виноградных выжимок, солодовой шелухи и др. Выход осажденного фермента был до 4—6% веса культуры гриба. В реакционной смеси при 0,005 *г* препарта на 0,5 *г* пектина через 4 *час* отмечен гидролиз до 70% внесенного пектина, через 18 *час* — гидролиз пектина до 85—90%. Испытание препарата в производственных условиях при получении соков черной смородины, алычи, сливы, добавленного в количестве 0,003%, показало, что выход соков повышается на 15—20%, виноградного сусла — на 3—4%. Полное осветление соков и виноградного сусла наступало через 3—6 *час*.

По данным Высоцкой [1], в производственных условиях эффективны препараты пектолитических ферментов, полученные из пленки *Asp. niger* — продуцента лимонной кислоты. Из водной вытяжки мицелиальной пленки *Asp. niger* на среде для лимоннокислого брожения пектиназа осаждается 55% (объемными) изопропилового спирта; выход неочищенного препарата — до 2,5% сухого веса пленки. При добавлении 0,006%—0,01% такого препарата, по данным опыта авторов, за 4 *час* происходило полное осветление свежеприготовленного яблочного сока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аймухамедова Г., Шелухина Н. Пектиновые вещества и методы их определения. ИЛИМ, Фрунзе, 1964.

1а. Высоцкая М., Получение пектолитических ферментов из отходов производства лимонной кислоты.— Внедрение фер. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.) ч. II, Цинтипищепром, М., 1961.

2. Гапоненков Т., Проценко З. О расщеплении пектиновых веществ ферментами микроорганизмов и химической природе конечных продуктов.— Микробиология, 1960, **29**, 658.

3. Коган С., Шаврук А. Опыт применения пектолитического ферментного препарата.— Спирт. пром., 1962, **8**, 34.

4. Кувикова А. Применение очищенных препаратов пектиназы для осветления плодово-ягодных соков.— Внедрение ферм. преп. (Сб. докл. на Всесоюз. конфер.). ч. II, Цинтипищепром, М., 1961.

5. Мартаков А., Дианова О. Обработка ягод перед извлечением сока ферментным препаратом аспергиллюс нигер.— Тр. Ин-та микробиол. и вирусол. АН Каз.ССР, 1962, 6, 146.

5а. Мартаков А., Дианова О. Глубинный биосинтез полигалактуроназы грибом *Asp. niger*.— Тез. докл. I. Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

6. Рашба О., Зайченко О. Вивчення активності пектинази у відходах міцелію при виробництві пеніциліну і стрептоміцину.— Мікробіол. ж. АН УРСР, 1962, **24**, 25.

7. Рейд В. Приготовление, свойства и испытание пектинрасщепляющих ферментов.— Докл. на симп. по произв. и прим. ферм. пищ. пром. Лондон. Пер. и ред. Р. Фениксовой, Пищепромиздат, М., 1963, 35.

8. Сутидзе К. Влияние серой гнили *Botrytis cinerea* на урожай винограда, выход сусла и качество вина. Тр. Ин-та садовод. виноград. и винод. Груз.ССР, **14**, 1962.

8а. Сапожникова Е. Особенности превращения углеводов, в том числе пектиновых веществ, при созревании и хранении различных плодовых культур.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

9. Талиева М., Плотникова Ю. Роль пектинолитических ферментов, выделяемых грибами в патогенезе растений.— Бюл. Глав. бот. сада АН СССР, 1962, 47, 53.

10. Хейнглейн Ф. Пектины. Биохимические методы анализа растений под ред. М. Запрометова. ИЛ, М., 1960, 280.

11. Херсонова Л. Определение активности пектинрасщепляющих ферментных препаратов.— Спирт. пром., 1963, **7**, 15.

11а. Херсонова Л. Влияние состава питательной среды на синтез плесневыми грибами пектинрасщепляющих ферментов.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

12. Чарли В. Применение ферментов при обработке и хранении соков и других фруктовых продуктов.— Докл. на симп. по произв. и примен.

ферм. в пищев. пром. Пер. и ред. Р. Фениксовой. Пищепромиздат, М., 1963, 106.

13. Чекан Л., Метод определения экстрактивных веществ плодов с применением технического пектолитического препарата.— Тр. НИИПП. Пищепромиздат, М., 1961, 8, 104.

14. Ashour W. Pectinase production by *Botrytis cinerea* and *Pythium debaryanum*.— Trans. Brit. Mycol. Soc., 1954, **37**, 343.

15. Bateman D. Pectolytic activities of culture filtrates of *Rhizoctonia solani* and extracts of Rhizoctonia-infected tissue of the bean.— Phytopathology, 1963, **53**, 197.

16. Bateman D. The macerating enzyme of *Rhizoctonia solani*.— Phytopathology, 1963, **53**, 1178.

17. Berker K., Walker I. Relationship of pectolytic and cellullytic enzyme production by strains of *Pellicularia filamentosa* to their pathogeneity.— Phytopathology, 1962, **52**, 1119.

18. Bogdanski K., Ziolecki A. Wlasności pectolyczne niektorych szczepów pleśni w zastosowaniu do klarowania mozczów.— Acta microbiol. Polon, 1956, **5**, 411.

19. Chandra S., Tandon R. Studies on the pectolytic enzymes of *Aspergillus terreus* Thom.— Mycopathol. et mycol., 1963, **19**, 216.

20. Clendon I., Somers G., Heuberger S. The occurrence of a variety of enzymes hydrolyzing cell wall polysaccharides in apples rotted by *Botryospheria ribis*.— Phytopathology, 1960, **50**, 258.

21. Collins R., Slenjeski W. Pectolytic enzymes produced by *Botryospheria ribis* and *Penicillium italicum*.— Mycologia, 1960, **52**, 455.

22. Deese D., Stahmann M. Pectic enzymes and cellulose formation by *Fusarium oxysporum* f. *cubense* on stem tissues from resistant and susceptible banana plants.— Phythopathology, 1962, **52**, 247.

23. Donnell K. Relationship of pectic enzymes and pathogenicity in the fusarium wilt of tomatoes.— Trans. Brit. Mycol. Soc., 1962, **45**, 55.

24. Deuel H., Stutz E. Pectic substances and pectic enzymes.— Adv. Ensymol., 1958, **20**, 341.

25. Echandi E., Walker L. Pectolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum* Echandi E.— Phytopathology, 1957, **47**, 303.

26. Frorcks W., Puffe D. Zur Frage des Pektins und Zelluloseabbaus in Moorböden.— Zs. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkude, 1961, **92**, 46.

27. Gothoskar S. et al. The role of enzymes in the development of fusarium wilt of tomato.— Phytopathology, 1955, **45**, 381.

27a. Grossmann F. Untersuchungen über die Hemmung pectolytischer enzyme von *Fusarium oxysporum*.— Phytopathol. Zs., 1962, **45**, 139.

28. Gupta S., Pandey D. Studies in pectic enzymes of parasitic fungi. Factors affecting the production of protopectinase enzyme by *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. ex Fr.) Zind.— Proc. Indian Acad. Sci., 1959, **50**. 75.

29. Gupta S. Studies in pectic enzymes of parasitic fungi. III. Secretion of pectic enzymes by *Penicillium expansum* Link.— Proc. Indian Acad. Sci., 1960, **52**, 103.

30. Hadley G., Perombelon M. Production of pectic enzymes by *Rhizoctonia solani* and orchid endophytes.— Nature, 1963, **200**, 1337.

31. Hamilton I., Johnston R. Studies on cucumber softening under commercial salt-stock conditions in Ontario. II. Pectolytic microorganisms isolated.— Appl. Microbiol., 1961, **9**, 128.

32. Heitefuss R., Stahmann M., Walker S. Production of pectolytic enzymes and fusaric acids by *Fusarium oxysporum* f. *conglutinans* in relation to cabbage yellow.— Phytopathology, 1960, **50**, 367.

33. Holden M. A study of enzymes that can break down tobacco. 3. Fungal polygalacturonase on leaf fibre.— Biochem. J., 1950, **47**, 415.

34. Hortway D., Seaking S. The influence of tannins on the degradation of pectin by pectinase enzymes.— Biochem. J., 1958, **70**, 158.

35. Husain A., Rich S. Extracellular pectic and cellulolytic enzymes of *Cladosporium cucumerinum*.— Phytopathology, 1958, **48**, 316.

36. Husain A., Kelman A. Tissue is disintegrated, Plant pathology.— Acad. Press, 1959, **1**, 144.

37. Jermyn M., Tomkins R. The chromatographic examination of the products of the action of pectinase on pectin.— Biochem. J., 1950, **47**, 437.

38. Kamal M., Wood R. Pectic enzymes secreted by *Verticillium dahliae* and their role in the development of the wilt disease of cotton.— Ann. Appl. Biol., 1956, **44**, 2, 322.

39. Lakshminarayanan K. In vivo detection of pectin methylesterase in the fusarium wilt of cotton.— Naturwissenschaften, 1957, **44**, 93.

40. Lakshminarayanan K. Adaptive nature of pectin methylesterase formation by *Fusarium vasinfectum* Alk.— Physiol. plan., 1957, **10**, 877.

40a. Leal A. Lack of pectic enzyme production by nonpathogenic species of *Verticillium*.— Nature, 1962, **195**, 1328.

41. Nour E., Dein M., Sharkas M. Pectolytic enzyme activity of *Rhizoctonia solani*.— Phytopathol. Zs., 1963, **48**, 439.

42. Page O. Quantitative paper-Chromatographic techniques for the assay of products of polygalacturonase activity of fungus cultures.— Phytopathology, 1961, **51**, 337.

43. Pierson C. et al. Histological studies on the role of pectic enzymes in the development of fusarium wilt symptoms in tomato.— Phytopathology, 1955, **45**, 10, 524.

44. Ragheb H., Fabian F. Growth and pectolytic activity of some tomato molds at different pH levels.— Food Res., 1955, **20**, 6, 614.

45. Roboz E., Barratt R. Breakdown of pectic substances by a new enzyme from Neurospora.— J. Biol. Chem., 1952, **195**, 459.

46. Saito H. Pectic glucosidases of *Aspergillus niger*.— J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo), 1955, **1**, 38.

46a. Sherwood R., Kelmann A. Measurement of pectinolytic and cellulolytic enzyme activity by rotating spindle viscometry.— Phytopathology, 1964, **54**, 110.

47. Singh R., Wood R. The production and properties of pectic enzymes secreted by *Fusarium moniliforme*.— Rapp. et communs. Huitieme Congr. Int. bot. Paris, 1954, 18; 119.

48. Singh G., Husin A. Production of pectic and cellulolytic enzymes by Arhar wilt fungus.— Current Sci., 1962, **31**, 3, 110.

49. Sommer N. et al. Production of pectolytic enzymes by *Rhizopus stoloniferum* 'sporangiospores after «lethal» gamma irradiation.— Appl. Microbiol., 1963, **11**, 463.

50. Spalding D., Bruehl G., Foster R. Substrate utilisation and pectolytic and cellulolytic and polysaccharide production by *Cephalosporium gramineum* (Abstr.).— Phytopathology, 1959, **49**, 551.

51. Spalding D., Bruehl G., Foster R. Possible role of pectinolytic enzymes and polysaccharide in pathogenesis by *Cephalosporium gramineum* in wheat.— Phytopathology, 1961, **51**, 227.

52. Spalding D. Production of pectinolytic and cellulolytic enzymes by *Rhizopus stoloniferum*.— Phytopathology, 1963, **53**, 929.

53. Srivastava D., Echandi E., Walker J. Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by *Rhizopus stoloniferum*.— Phytopathology, 1959, **49**, 145.

53a. Strider D., Winstead N. Production of cell-wall dissolving enzymes by *Cladosporium cucumerinum* in cucumber tissue and in artificial media.— Phytopathology, 1961, **51**, 765.

54. Trione E. Extracellular enzymes and toxin production by *Fusarium oxysporum* f. *lini*.— Phytopathology, 1960, **50**, 7, 480.

55. Tuttobello R., Mill P. The pectin enzymes of *Aspergillus niger*.— Biochem. J., 1961, **79**, 1, 51.

56. Uritani I., Stahmann M. Pectolytic enzymes of *Ceratocystis fibriata.*— Phytopathology, 1961, **51**, 277.
57. Waggoner P., Dimond A. Production and role of extracellular pectic enzymes of *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici.*— Phytopathology, 1955, **45**, 79.
58. Wieringa K. Der Abbau der Pectine, der erste Angriff der organischen Pflanzensubstanz.— Zs. Pflanzernähr. Düng. Bodenkunde, 1955, **69**, 1; 150.
59. Winstead N., Walker J. Production of vascular browning metabolites from several pathogens.— Phytopathology, 1954, **44**, 153.
60. Winstead N., McCombs C. Pectinolytic and cellulosolytic enzyme production by *Pythium aphanidermatum.*— Phytopathology, 1961, **51**, 5, 270.
61. Winstead N., McCombs C. Production of pectinolytic and cellulolytic enzymes by anthracnose fungi.— Phytopathology, 1963, **53**, 961.
62. Wood R. Pectic and cellulolytic enzymes in plant disease.— Ann. Rev. Plant Physiol., 1960, **11**, 299.
63. Wood R. Verticillium wilt of tomatoes — the role of pectic and cellulolytic enzymes.— Ann. Appl. Biol., 1961, **49**, 120.

ПРОТЕИНАЗЫ

Протеиназы гидролизуют белки и полипептиды. Роль белков в жизни всех живых организмов — человека, животных, растений, микроорганизмов — исключительно велика. Они являются наиболее многочисленной и распространенной группой природных соединений и составляют материальную основу жизненных процессов. К белкам принадлежат ферменты, опорные и защитные белки (коллаген, кератин) в животном организме, белки мышц (миозин и др.). От углеводов и других соединений белковые вещества отличаются не только тем, что они обязательно содержат азот, часто серу, реже фосфор, но и, особенно, тем, что представляют собой наиболее сложные органические соединения. Это — высокомолекулярные коллоидные вещества; молекулярный вес отдельных из них доходит до нескольких миллионов.

При химическом или ферментативном гидролизе белков образуются аминокислоты, состав которых у различных белков неодинаков. Отдельные аминокислоты в молекуле белка связаны так называемыми пептидными связями, т. е. такими, в которых аминная группа одной аминокислоты соединена с гидроксильной группой другой. В зависимости от числа пептидных связей аминокислот различают дипептиды, трипептиды, тетрапептиды, пентапептиды и полипептиды — соединения с бо́льшим числом аминокислот в молекуле. Так, только при различной комбинации из 20 аминокислот в пептидной цепи может быть 2.10^{18} различных соединений.

Наряду с различными типами полипептидных связей в молекуле белка имеются дисульфидные, сложноэфирные, водородные. Наличие в его молекуле различных свободных групп и радикалов, карбоксильных, гидроксильных, сульфгидрильных,

сульфидных, амидальзольных и других, их различное пространственное положение обусловливает многообразие реакционных возможностей молекулы белка или отдельных ее фрагментов. По форме молекул различают белки фибриллярные — нитевидные и глобулярные — шаровидного строения.

При выделении из природных субстратов белковые вещества легко денатурируются. Во избежание этого необходимо выделение и соответствующую обработку природного материала проводить на холоду (—3—5° С), при определенных показателях pH и изоэлектрической точки раствора.

Белки разделяют на протеины, или простые белки, состоящие из остатков аминокислот (к ним относятся запасные и скелетные белки), и протеиды, или сложные белки, молекулы которых состоят из белка в соединении с веществами небелковой природы — жирами, углеводами, металлами, органическими кислотами. Кроме этого, различают также отдельные группы белковых веществ, отличающиеся растворимостью, химическим строением и физико-химическими свойствами. Это, например, альбумины, глобулины, проламины, фосфоропротеины и другие, относящиеся к протеинам: липопротеиды, глюкопротеиды, нуклеопротеиды и другие, относящиеся к протеидам (Кочетков и др., 1964).

Первоначальное выделение белковых веществ из природных субстратов наиболее часто принято производить путем экстракции на холоду водой, солевыми, водно-спиртовыми или слабощелочными растворами с последующим осаждением или высаливанием их таннином, трихлоруксусной кислотой, этанолом, сульфатом аммония (наиболее часто для ферментов), а также фракционированной хроматографией, электрофорезом и другими методами. Пользуясь рядом специфических реакций, определяют характерные группы, входящие в состав белков. Так, ксантопротеиновой реакцией определяют белки, содержащие бензольные кольца; реакцией Миллонова — фенольные группы белка; биуретовой — группировку $\begin{matrix} & & | & \\ & \| & & | \\ O & & & H \end{matrix}$; Адамкевича — индольные группировки.

Для качественного и количественного определения пептидов при гидролизе белков пользуются специфической биуретовой реакцией (с солями меди в щелочной среде), сопровождаемой различным окрашиванием компонентов. Дипептиды дают синее окрашивание с максимумом поглощения в УФ области 610 *ммк;* трипептиды — фиолетовое с максимумом поглощения 580 *ммк;* тетра- и полипептиды — розовое с максимумом поглощения 500 *ммк*. Исследования по характеристике строения пептидов при первоначальном их изучении включают определение качественного и количественного состава аминокислот при полном

их гидролизе, размера пептидной цепи, определяемой отношением аминного азота к общему ($\frac{NH_2}{N}$). Для дипептидов оно равно 50%, для трипептидов — 33%, для тетрапептидов — 25%.

Ферментативное расщепление и синтез белков и аминокислот являются весьма сложными, разнообразными процессами, имеющими исключительно важное значение в обмене веществ. Расщепление белков до конечных продуктов — аминокислот и аммиака,— осуществляемое комплексом ферментов, включает такие процессы, как их гидролиз, окислительное и восстанови-

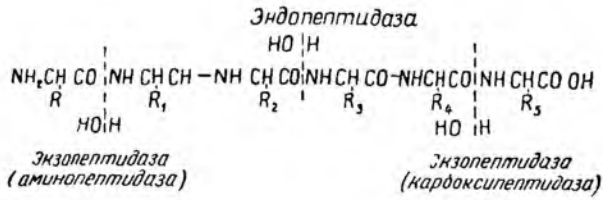


Рис. 26. Характер действия протеиназ на фрагмент молекулы белка (по Андеркофлеру).

тельное дезаминирование аминокислот, анаэробный распад, анаэробное декарбоксилирование аминокислот, распад мочевины и др. При этом наряду с процессами распада белков происходит также и синтез новых аминокислот и иных соединений. Образуемый аммиак путем прямого аминирования кетокислот, дезаминирования аминокислот и образования их амидов включается в новые аминокислоты и другие соединения. Образуемые при гидролизе белков аминокислоты под воздействием соответствующих ферментов могут подвергаться декарбоксилированию, метилированию, превращаться в амины и принимать участие в синтезе многих сложных органических веществ.

Протеиназы гидролизуют расщепление пептидной связи белков и полипептидов.

Различают две основные группы протеолитических ферментов: эндопротеиназы, или протеиназы, осуществляющие гидролитическое расщепление белков, главным образом по внутренним пептидным связям с образованием пептидов с более низким молекулярным весом, и экзопротеиназы, или пептидазы, расщепляющие концевые фрагменты молекулы с карбоксильного или аминного конца, с образованием аминокислот (рис. 26).

К протеиназам относятся хорошо изученные, выделенные в кристаллическом виде ферменты желудочного сока — пепсин (pH 1,2—1,5), трипсин (pH 8—9), а также сычужный фермент, или химозин (раннин), вызывающий свертывание молока, и

многие ферменты растительного происхождения (папаиназы) (pH 4,0—5,5).

Пептидазы обладают выраженной специфичностью действия на определенные химические группировки в пептидных связях. Так, аминопептидазы расщепляют пептидную связь при наличии вблизи с ней аминной группы, а карбоксипептидазы — карбоксильной; дипептидаза — расщепляет дипептиды; пролиназа расщепляет пептидную связь при наличии карбоксильной группы пролина; пролидазы — гидролизуют пептидные связи, где азот пролина связан кислотноамидной связью и т. д.

Способность усваивать белки в качестве источников азота и углерода свойственна представителям различных таксономических групп гифальных микромицетов. Наличие протеолитических ферментов отмечено у Mucorales — родов *Mucor, Rhizopus, Mortierella* и многих других грибов, активно разжижающих желатину.

Работа Ваксмана и Стэркей [52] представляет одну из первых по изучению и усвоению белков различными почвенными микроорганизмами. Авторы изучали сравнительное разложение белков растительного и животного происхождения — зеина, глиадина, эдестина, казеина, альбумина — некоторыми видами почвенных бактерий, актиномицетов и грибов. Из последних изучались *Rhizopus* sp., *Trichoderma koningi.* Отмечено, что *Rhizopus* sp. рос в минеральной среде с эдестином, фибрином, желатиной, яичным альбумином как источниками углерода и азота; *Tr. koningi* — на среде с эдестином, зеином, гладианом, казеином. При этом, белки использовались более быстро, если в среде не было других источников углерода (глюкозы); их гидролиз на ранней стадии приводил к накоплению в среде значительного количества аминного азота, или аммиака.

В последнее время способность многих видов гифальных микроцетов разжижать желатину или гидролизовать другие белки отмечается многими авторами. В обзорных работах по ферментам указываются виды Mucorales — *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Cunninhamella* sp., *Mortierella renispora* и др., виды родов *Penicillium, Aspergillus (Asp. oryzae, Asp. parasiticus, Asp. terricola),* образующие протеолитические ферменты [36].

Однако наиболее полно изучены и практически используются только упомянутые виды аспергиллов.

Протеолитические свойства других представителей широко распространенных родов и видов микромицетов — фузариев, пенициллов, аспергиллов — изучены мало.

Грибные протеазы различают по их отношению к pH: нейтральные (pH 6—7,5), щелочные (pH 8—11,0), кислые (pH 2,5—3,0). Так, например, многие виды фузариев при росте на водной желатине с нейтральной (pH 7,0) и кислой (pH 3,5) реакцией быстрее разжижали ее в последнем случае (табл. 22).

Как видно из табл. 22, почти у всех изученных видов фузариев (кроме *F. lateritium* и частично *F. gibbosum* v. *acuminatum*) значительно быстрее наступало полное разжижение кислой желатины — на 10—20-й день роста; полное разжижение шелочной желатины наступало только на 75-й день роста.

Изученные виды *Fussarium* также активно росли на среде с пептоном с образованием аммиака, на среде с альбумином, на молоке и молочном агаре.

Кислого типа аспергиллопептидаза из *Asp. saitoi* активирует трипсиноген, разрушает 16 из 29 связей в В-цепи инсулина, pH 2,5—3,0; на синтетических пептидных субстратах оптимум pH 4,5.

Очищенный препарат протеиназы, активной при pH 3,0, полученный из *Pen. janthinellum,* также активировал трипсиноген, но осуществлял гидролиз А-цепи инсулина.

Нейтрального типа протеиназы из *Asp. ochraceus, Asp. oryzae* обладают способностью к гидролизу большого числа белков (pH 6,0—7,6).

Щелочного типа протеиназы из *Asp. oryzae* (pH 8,0) имеют широкий спектр действия; протеиназы из *Asp. soya, Pen. cyaneofulvum* с оптимумом действия при pH 9,5—11,0 отличаются определенной специфичностью действия.

Из *Asp. flavus, Asp. niger* получены очищенные препараты, гидролизующие кератин эпидермиса, волос, ногтей и других кератиносодержащих субстратов [36].

Таблица 22

Разжижение желатины разными видами *Fusarium* (время полного разжижения столбика в 30 *мм*, в днях)

Субстрат	*Fus. meris-moides*	*Fus. sporo-trichiella*	*Fus. avena-ceum*	*Fus. avena-ceum* v. *sar-cochroum*	*Fus. gibbosum* v. *sctrpi*	*Fus. gibbosum* v. *sctrpi*	*Fus. gibbosum* v. *acuminatum*	*Fus. lateri-tium*	*Fus. monili-forme*	*Fus. oxyspo-rum*	*Fus. oxyspo-rum* v. *orthoce-ras*	*Fus. javani-cum*	*Fus. solani*	*Fus. solani* v. *martii*
12%-ная кислая (pH 3,7) водная желатина	20	10—15	20	10	20	20	40	75	10	10	15	20	20	10
12%-ная щелочная (pH до 8,0) водная желатина	75 (20 *мм*)	75	75	75	75	75 (20 *мм*)	75 (10 *мм*)	75	75	75	75	75	75	40

Активность образования протеиназ зависит от состава среды. Обычно при культивировании грибов на средах, содержащих белки, синтез протеолитических ферментов значительно активнее, чем на средах, не содержащих их.

При гидролизе белков разные виды микроскопических грибов образуют комплекс протеолитических ферментов, но в ряде случаев разные штаммы одного вида могут неодинаково усваивать различные белки.

Иошида и Нагасава [53] изучили протеолитические ферменты видов группы *Aspergillus niger — A. saitoi, A. usamii, A. awamori.* Авторы показали, что ферменты этих видов аспергиллов относятся к протеиназам кислого типа (pH 2,5—3,5) и отличаются рядом свойств от протеиназ видов *Asp. oryzae, Asp. flavus* и др. Протеиназы изученных авторами видов черных аспергиллов имеют оптимальное pH 2,5—3,0 при гидролизе молочного казеина, устойчивы при pH 2 к температуре 35° С (в течение часа). В связи с устойчивостью протеаз черных аспергиллов к кислотам они могут найти применение в тех случаях, где щелочные протеиназы являются неактивными.

Авторами получена очищенная протеиназа из *Asp. saitoi* и изучены ее свойства. Очистка производилась путем фракционированного осаждения этанолом, сульфатом аммония и ацетоном (после предварительной адсорбции крахмалом из водного раствора неочищенного фермента).

Выход очищенного фермента составлял 3% к исходному неочищенному препарату с активностью в 6 700 *ед.* специфической активности (*ед/мг* белка). Для первоначальной очистки применялись ионообменные смолы, буферированные при pH 3,5: амилаза элюирована 0,02 М ацетатным буфером во фракции 2—3 и протеаза — 0,5 М ацетатным буфером при pH 5,25 с 60—70% выхода. Этим методом разделяется протеиназа и амилаза также и у *Asp. niger.*

В кристаллическом виде протеиназа из элюата получена фракционированным осаждением сульфатом аммония и ацетоном. По данным авторов, молекулярный вес кристаллической протеиназы *Asp. saitoi* равен 93 000—98 000, ее активность составляет $^1/_2$ активности кристаллического пепсина по гидролизу молочного казеина, действие — в пределах pH 1—6, оптимум — при pH 2—3. При действии на яичный альбумин и молочный казеин установлено, что в отличие от пепсина протеиназа *Asp. saitoi* расщепляет эти белки на более мелкие фрагменты (рис. 27). При хроматографическом изучении продуктов гидролиза молочного казеина отмечено, что под действием пепсина образуются лейцин, валин, глютаминовая кислота; под действием протеиназы *Asp. saitoi* — большое количество лейцина, фениллаланин, лизин, глютаминовая кислота, глютамин, серин, аргинин. По основным функциональным группам протеиназа

Asp. saitoi не отличается от пепсина. Значительные отличия отмечены в субстратной специфичности. Гидролиз белков протеиназой гриба происходит без активаторов. Протеиназа *Asp. saitoi,* по данным авторов, гидролизует α-бензил-l-орнитин амид (специфический субстрат для трипсина, папаина, бромелина, протеиназы *Clostridium histilyticum,* стрептококкового катеп-

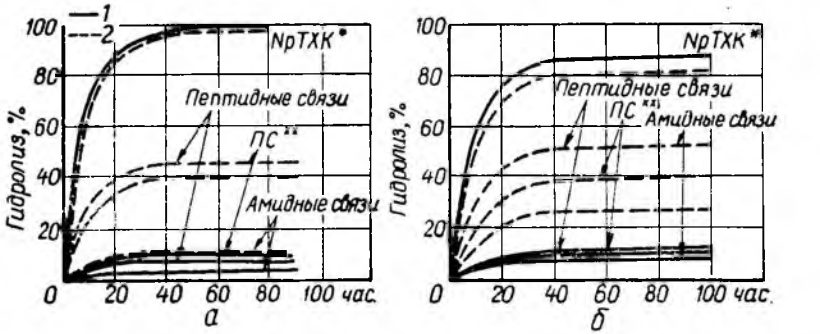


Рис. 27. Гидролиз молочного казеина (*а*) и яичного альбумина (*б*) протеиназой *Aspergillus saitoi* и пепсином (по Ioshida, Nagasava):
1 — протеиназа *Asp. saitoi*; *2* — пепсин.
* Азот, растворимый в трихлоруксусной кислоте.
** N-соединения, определяемые по методу Поп-Стивенса.

сина), который не гидролизуется пепсином. Протеиназа гриба гидролизует также карбо-бензокси-*l*-глютамил-*l*-тирозин, который расщепляется пепсином, но не перечисленными выше ферментами. Авторы отмечают, что протеиназа этого вида аспергиллов может найти широкое применение не только как заменитель пепсина, но также для получения белковых гидролизатов, удаления белков из субстратов, имеющих низкое pH и др.

Горец и Стефанини [40] получили из *Asp. oryzae* B 1273 протеолитический фермент — аспергиллин О, активно разлагающий фибрин.

Гриб выращивали на среде следующего состава: сахарозы — 7,2 *г*, декстрозы — 3,6 *г*, K_2HPO_4 — 13,69 *г*, KNO_3 — 2 *г*, $MgSO_4$—1,23 *г* на 1 *л* с добавлением микроэлементов (Zn, Fe, Mn) и витаминов (солянокислого тиамина или пиридоксина).

Изучено влияние различных источников азота, углерода и других факторов на активность образования фермента.

У видов *Penicillium, Aspergillus* выделены различными авторами ферменты, которые при кислой среде (pH 2,5—4,0) активируют трипсиноген до трипсина.

Наканиши [48] путем очистки ионообменной смолой фермента *Asp. niger* получил гомогенный при бумажном электрофорезе препарат кислой протеазы, которую автор считает

идентичной трипсиногенкиназе. Изучена активация трипсиногена этим ферментом, а также трипсином и энтерокиназой.

Методом бумажной хроматографии определялись образуемые при активации трипсиногена нингидрин-положительные продукты в реакционной смеси трипсиногена и кристаллической трипсиногенкиназы *Asp. niger*.

Реакционная смесь: 70 *мг* трипсиногена в 20 *мл* буфера Вальпоне, pH 3,5+50 *мг* киназы; реакция при 0° С. Через 0,5—

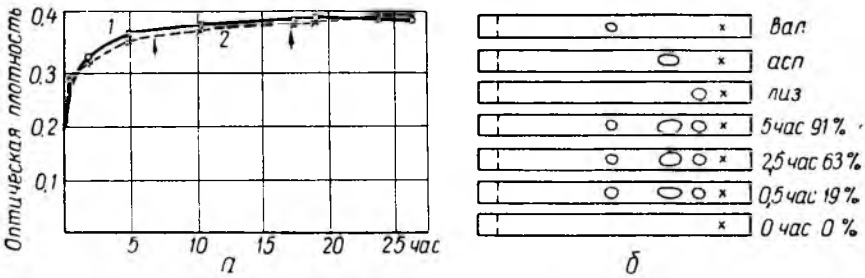


Рис. 28. Трипсиногенкиназа *Aspergillus niger* (по Nakanishi):

а — кривые гидролиза двух трипсинов, активируемых трипсином (*1*) и трипсиногенкиназой (*2*); *б* — бумажная хроматограмма нингидринположительных соединений при гидролизе трипсиногена трипсиногенкиназой *Asp. niger*.

2,5 и 5 *час* отбирались пробы, к которым для адсорбции аминокислот добавлялась смола (Amberlite R—120, H-форма); pH снижалось до 1,4. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение часа, затем смолу смешивали с равным объемом воды и дважды экстрагировали 15 *мл* 5-н. NH_4OH. Экстракт упаривали под вакуумом и хроматографировали в системе бутиловый спирт: уксусная кислота: вода (4 : 2 : 1).

Через 0,5 *час* реакции отмечено 19% активации трипсиногена и пятно, соответствующее валину; через 2,5 *час* — 63% активации и пятно, соответствующее аспарагиновой кислоте; через 5 *час* — 91% активации и пятно, соответствующее лизину (рис. 28). Первоначально образуемое в процессе активации трипсина трипсиногенкиназой *Asp. niger* соединение валин (аспарагин)$_4$—лизин в дальнейшем частично гидролизуется в валин (аспарагин)$_4$ и лизин.

Сравнительное изучение ферментативной активности трипсина, активируемого трипсиногенкиназой *Asp. niger* и трипсином по интенсивности гидролиза казеина, показало, что эти препараты одинаково активны (рис. 28). Трипсин, активированный трипсиногенкиназой *Asp. niger,* также активно гидролизовал бензоил-аргинин-амид — специфический субстрат для трипсина (табл. 23).

Гофман и Шоу [39а, 39б, 49а] установили наличие двух пептидаз у *Penicillium janthinellum* — пептидазы А, обладаю-

Таблица 23

Гидролиз бензоил-аргинин-амида трипсинами, активированными трипсином и трипсиногенкиназой *Asp. niger*

Гидролизирующие ферменты	Процент гидролиза
Трипсин, активированный трипсином	84
Трипсин, активированный трипсиногенкиназой *Asp. niger*	86

Реакционная смесь: 1 *мл* бензоил-аргинин-амида 3×10^{-2} М, pH 8,0, буфер 1 *мл*, трипсин 200 *мкг/мл* 1 *мл*

щей способностью активировать трипсиноген при pH 3—4 и пептидазы В.

Авторами изучены методы изоляции, молекулярный вес, субстратная специфичность, кинетика катализа и другие молекулярные и ферментативные их свойства.

Синг и Мартин [50] из культуральной жидкости *Penicillium cyaneo-fulvum* получили протеиназу осаждением сульфатом аммония после предварительной обработки ее 1%-ным раствором $CuSO_4$; затем фракционировали этанолом и осаждали сульфатом аммония.

Гриб выращивали погруженным методом в течение 7—8 дней на среде, содержащей 10 *г* пептона (Difco); 10 *г* глюкозы; 2,5 *г* NaCl; 0,2 *г* KCl; 0,1 *г* $CaCl_2$ на 1 *л;* pH 7,0. К концу указанного срока pH культуральной жидкости достигало 8,2—8,5 и отмечался максимум протеазной активности. Ультрацентрифугированием и электрофорезом при pH 4,5—7,5 обнаружено, что полученный препарат протеазы является однородным, имеющим молекулярный вес до 45 000. Но при электрофорезе в более щелочной среде выявлено два компонента; изоэлектрическая точка pH 3—4,0. Оптимум pH для казеолизиса равен 9,5—11,0. Активность фермента ингибируется цинком, ртутью; снимается угнетение активности этилендиамино-тетрацетоновой кислотой.

Авторы относят протеазу *Pen. cyaneo-fulvum* к трипсинохимотрипсиновому типу эндопептидаз. Проведены исследования по установлению специфической цепи гидролиза молекулы белка протеиназой *Pen. cyaneo-fulvum* с использованием синтетических пептидов и аминокислот. Протеиназа *Pen. cyaneo-fulvum* гидролизует казеин, гемоглобин, желатину, сывороточный альбумин, инсулин, коагулирует молоко.

Акацука и Сато [34] получили однородные высокоактивные пептидазы *Aspergillus oryzae* — дипептидазы и аминопептидазы.

Бергквист [35] изучал методы выделения и свойства протеазы *Asp. oryzae*. Автором разработаны методы выделения при помощи таннина концентрированных протеолитических ферментов из культуральной жидкости гриба и последующего их разделения хроматографией на колонках диэтиламиноэтилцеллюлозы. Установлено наличие трех компонентов в протеазе *Asp. oryzae*.

Специфичность протеолитических ферментов в отношении гидролиза различных белков изучена мало. Между тем, исследования подобного рода имеют значение как для характеристи-

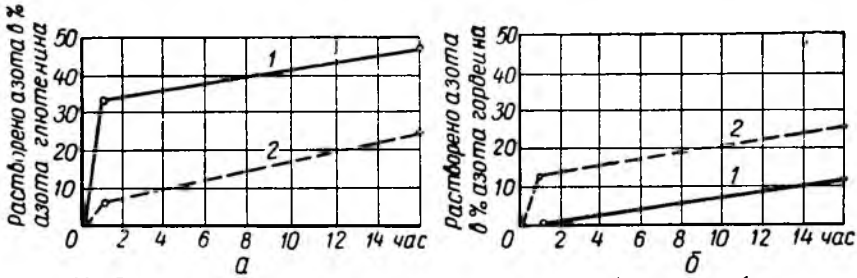


Рис. 29. Сравнительная протеолитическая активность ферментов *Asp. oryzae* (*1*) и ячменного солода (*2*) при действии на:

а — щелочерастворимый белок ячменя (глютенин); *б* — спирторастворимый белок ячменя (гордеин) (по Козловскому).

ки ферментов, так и для их эффективного практического применения. Козловский [17] установил, что протеазы *Asp. oryzae* являются высокоактивными по отношению к гидролизу глютенина (щелочерастворимая фракция) и слабо активными по отношению к гордеину (спирторастворимая фракция белка). Протеаза *Asp. oryzae* была наиболее активна по отношению к белкам зерна пшеницы, ржи, затем ячменя, слабее кукурузы и риса. В последнем случае гидролиз растворимых белков кукурузы и риса под воздействием протеазы *Asp. oryzae* происходил значительно активнее, чем гидролиз нерастворимых белков зерна злаков. Автором изучено влияние температуры, pH на активность гидролиза белков различных злаков протеазами гриба *Asp. oryzae*. Фермент, по данным автора, значительно активнее протеаз ячменного солода, в особенности по активности пептидаз (рис. 29). Его применение в заторах положительно влияет на азотистый состав пивного сусла и пива, повышая его коллоидную стойкость. Денатурированные термической обработкой белки зерна в заторе активнее гидролизуются протеазой *Asp. oryzae*.

Протеолитическую активность разных видов грибов и отдельных штаммов группы *Asp. flavus-oryzae* исследовали Калашников и Трайнина [13], культивируя их на среде из пшеничных отрубей при 30° С в течение 48 *час*.

Как видно из приведенных ниже данных, наиболее активными были испытанные штаммы *Asp. flavus, Asp. tamarii,* которые к тому же обладали низкой амилолитической активностью. В качестве субстрата для определения протеолитической активности в опытах авторов использован казеин. Единица активности (ПС) — число миллиграмм казеина, расщепленного до продуктов, не осаждаемых сульфатом аммония в азотнокислой среде (в пересчете на 100 *г* сухой культуры на отрубях).

Протеиназная и пептидазная активность у разных штаммов не совпадает (табл. 24, 25).

Таблица 24

Протеолитическая (ПС) и амилолитическая (ОС) активность обследованных видов плесневых грибов
(культивирование 48 *час* при 30° С; влажность питательной среды 60%)

Вид грибов	Число обследованных штаммов	ПС		ОС	
		миним.	макс.	миним.	макс.
Aspergillus oryzae	18	84	500	63	310
« *flavus*	26	400	1240	9	47
« *niger*	6	18	25	2	110
« *tamarii*	1	—	400	—	—
« *terricola*	1	—	270	—	25
« *alleaceus* . . .	1	—	200	—	—
« *awamori*	1	—	180	—	—
Rhizopus delemar	1	—	84	—	36
« *oryzae*	1	—	50	—	25
« *tonkinsis*	1	—	10	—	50
Mucor Rouxii	1	—	1	—	20
« *Danilowitsch* . .	1	—	12	—	30

Дгар и Бос [37] изучали активные центры протеаз *Asp. parasiticus.* Протеолитическая активность определялась по количеству освобожденного тирозина в 5 *мл* реакционной смеси, состоящей из 20 *мл* 2,5%-ного раствора яичного альбумина pH 7,5; 0,03 *мл* раствора фермента (2 *мг*/100 *мл*), при 40° С, в течение 25 *мин.* Изучено влияние ряда окислителей, восстановителей, веществ, инактивирующих SH-группы, ионов металлов, безводной муравьиной кислоты, формальдегида, аланина на протеолитическую активность фермента, а также влияние йодирования, ацетилирования, гуанидирования на фермент и его протеолитическую активность (табл. 26).

На основании полученных данных авторы считают, что протеолитическая активность кристаллической протеазы *Asp. parasiticus* зависит от амидных и алифатических гидроксильных групп в молекуле фермента. Обработка последнего формальдегидом и аланином, безводной муравьиной кислотой, а

Таблица 25

Протеолитическая и амилолитическая активность отобранных штаммов плесневых грибов
(культивирование 48 *час* при 30° С)

№ штамма	Протеиназная активность (ПС)	Пептидазная активность (ПС)	Амилазная активность (ОС)	Отношение ОС:ПС
		Aspergillus flavus		
152	840	73	9	1 : 93
102	880	50	19	1 : 46
153	880	48	26	1 : 34
231	1000	49	20	1 : 50
290	1100	127	20	1 : 55
716	1240	125	47	1 : 26
		Aspergillus oryzae		
746	500	55	310	1 : 1,6

Таблица 26

Влияние восстановителей, окислителей, ингибиторов *SH*-групп и ионов металлов на протеазу *Asp. parasiticus*

Вещество	Протеолитическая активность	Вещество	Протеолитическая активность
Фермент — контроль . .	2,03	Малеиновая кислота . .	2,03
Гидрохлорид — цистеин .	2,01	Сонин	2,03
Глютатион	2,01	Натрий биосульфат . . .	2,03
Аскорбиновая кислота . .	2,03	Натрий триосульфат . .	2,01
Цианид натрия	2,01	п-Хлоро-ртутно-бензойная кислота	2,01
Тиогликоколевая кислота .	2,01	Азотнокислое серебро . .	0,48
Сульфид натрия	2,03	Медь сернокислая . . .	0,34
Перекись водорода . . .	2,01	Ртуть хлористая	0,30
Марганцевокислый калий .	2,03	Свинец хлористый . . .	0,48
Йодуксусная кислота . .	2,03	Железо хлористое . . .	0,14

также солями серебра, ртути, меди, свинца и железа значительно снижали протеолитическую активность *Asp. parasiticus.*

Вербина [7] обнаружила определенную взаимосвязь между активностью накопления биомассы и протеолитической активностью различных вариантов *Asp. nidulans,* полученных под воздействием ультрафиолетовых лучей при поверхностном и глубинном культивировании. Отмечено, что у сильно измененных вариантов, обладающих при поверхностном культивировании слабой степенью накопления биомассы, при выращивании глубинным методом степень накопления биомассы не отли-

чается от исходных культур. Протеолитическая же активность вариантов, характеризующихся слабой степенью накопления биомассы при поверхностном культивировании, весьма низкая и при глубинном росте.

Было установлено [29], что белки зерна пшеницы и гороха более активно расщепляются ферментами *Fusarium avenaceum,* чем альбумин и белки плазмы крови. Ферментативная активность определялась по изменению общего азота и азота аминокислот в реакционной смеси под воздействием водного экстракта из культуры *Fus. avenaceum* на стерильном зерне пшеницы. По полученным данным, протеолитические ферменты экстрактов культуры гриба на зерне активно расщепляют белки гороха до полипептидов и аминокислот. Из комплекса протеолитических ферментов гриба в экстракте протеиназы более активны в отношении белков пшеницы, а полипептидазы — продуктов распада белков гороха. Проведено сравнительное изучение азотистого метаболизма у дерматомицетов и некоторых других видов грибов.

Протеолитическая активность мицелия *Penicillium chrysogenum,* являющегося отходом при производстве пенициллина, изучалась рядом авторов.

Безбородова [2, 3] получила из мицелия штамма *Pen. chrysogenum,* «новый гибрид» (бежевый) активные неочищенные препараты протеазы, содержащие еще амилазу, каталазу, инвертазу. В опытах автора наибольшая степень извлечения ферментов из клеток гриба наблюдалась после 24—48-часового автолиза при 37° С отжатого от жидкости сырого мицелия. Осаждение фермента из автолизата проводилось этанолом или метанолом (4 объема), или ацетоном (3 объема). В целях предохранения от быстрой инактивации осадок фермента необходимо быстро обезвоживать этанолом или серным эфиром. Изучена активность в отношении разных белков при различных pH. По данным автора, неочищенные протеолитические ферменты из мицелия *Pen. chrysogenum* (новый гибрид) были наиболее активны в отношении казеина, затем желатины, пептона, кожного порошка. Препараты ферментов, полученные при осаждении этанолом, стойки к длительному хранению (свыше одного года). Протеолитические ферменты не инактивировались сероводородом, что дает основание автору считать их трипсиноподобными протеазами.

Маттисон [19, 20] получил активные протеолитические препараты из замороженного мицелия *Pen. chrysogenum,* являющегося отходом при производстве пенициллина, и разработал метод его применения при мягчении кожи.

Виноградова и др. [11], используя протеолитические ферменты *Asp. terricola,* получили гидролизаты казеина двух основных типов: 1) свободные от пептонов, с содержанием амин-

ного азота 600—900 *мг*% и 2) содержащие 3—5% пептона и 300—400 *мг*% аминного азота. В их опытах при изготовлении питательных сред для выращивания биомассы микробов с целью получения токсинов перфрингенс, септикус, гистолитикус, а также для выращивания бруцелл, рост микробов на средах с такими гидролизатами был хороший. Качество гидролизатов зависит от исходных препаратов казеина.

Применение протеиназ. Протеолитические ферменты применяются в отдельных отраслях пищевой и медицинской промышленности. Здесь прежде всего следует указать на использование протеиназ (бактериального и грибного происхождения) в кожевенной промышленности для обезволошивания и мягчения кож. Замена химической обработки кож для снятия волосяного покрова и их размягчения перед дальнейшей обработкой протеиназами микробного происхождения является весьма эффективной. Ферментативный способ обработки кож позволяет механизировать процесс, сокращает сроки обработки, улучшает условия труда и значительно повышает качество продукции. Бабакина [2] изучала комплекс протеиназ и других ферментов *Asp. oryzae, Asp. flavus, Asp. terricola, Asp. nidulans* и способы эффективного их применения в кожевенной промышленности (препарат оризон и др.).

В пивоваренной промышленности на конечных стадиях технологического процесса для удаления белков, дающих нежелательную муть пиву, его обрабатывают протеиназами. Желательная степень гидролиза белков в пиве — до образования пептидов крупного молекулярного веса, придающих пиву пеностойкость и аромат.

Протеиназы применяются в хлебопечении при изготовлении специальных сортов мучных изделий (сладких сортов хлеба, бисквитов и др.). Здесь также процесс ведется не до полного гидролиза белков муки. Частичный же гидролиз глютена муки способствует сокращению времени для размешивания теста, улучшает структуру и качество мучных изделий — пористость, аромат, вкус. Применение протеиназ в хлебопекарской промышленности создает благоприятные условия для деятельности амилолитических ферментов — освобождается большое число зерен для гидролиза амилазами [1].

По данным Андеркофлера [1], в США протеиназы применяются при изготовлении белковых гидролизатов различных пищевых белков, используемых для изготовления соусов и других приправ к пище, а также в мясной промышленности для размягчения мясных изделий (полуфабрикатов). В мясной и рыбной промышленности они могут использоваться не только для улучшения изделий, но также для переработки различных отходов с целью получения необходимых аминокислот, жиров и других важных веществ.

В медицине препараты протеиназ находят применение в качестве лечебных средств, а также при изготовлении диэтических продуктов питания. В последнем случае протеиназы используются для гидролиза белков с целью улучшения питательной ценности последних, перевариваемости, повышения качества изделий.

Дальнейшее изучение протеолитических свойств микроскопических грибов в направлении выявления высокоактивных штаммов продуцентов специфических протеиназ должно способствовать более широкому и разнообразному применению их в пищевой, легкой промышленности, в медицинской практике.

Одной из новых областей применения протеиназ грибов является промышленность по производству бактериальных медицинских препаратов — вакцин, токсинов, анатоксинов, фагов, сывороток. Как известно, для массового получения их соответствующие виды бактерий выращиваются на белковых средах.

В зависимости от биологических особенностей вида и цели применяют среды с разной степенью расщепления белка и, соответственно, содержания аминного азота и пептона.

Использование протеолитических ферментов грибов для гидролиза белков позволяет регулировать степень расщепления белка, создает лучшие условия для последующего роста бактерий и повышает выход соответствующего бактериального препарата.

По данным Виноградовой [12], применение протеаз из гриба *Asp. terricola* в производственных условиях является весьма эффективным. В опытах автора протеолитические ферменты *Asp. terricola* получались при выращивании гриба на отрубях, а также на экстракте из них при глубинном методе выращивания. Фермент содержится в мицелии и культуральной жидкости. Стимулирующее влияние на биосинтез *Asp. terricola* оказывает добавление к среде из экстракта отрубей минеральных солей, аспарагина, сахарозы или глюкозы, а также цинка и янтарной кислоты. Автор указывает, что протеиназа из грибов может быть применена также для переваривания белков бактериальной клетки, что необходимо при получении вакцин из полных антигенов, антитоксических сывороток и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андеркофлер Л. Производство и применение растительных и микробных протеиназ. Докл. на симп. по произв. и прим. ферм. пищ. пром. Лондон. Пер. и ред. Р. Фениксовой. Пищепромиздат. М., 1963, 48.

1а. Бабакина В. Применение ферментов в производстве кожи. Гостехиздат, 1962.

2. Безбородова С. Получение препаратов протеолитических ферментов из мицелия *Penicillium chrysogenum.*— Микробиология, 1960, **29**, 124.

3. Безбородова С. Определение активности протеиназ в стандартных единицах.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим., Л., 1964.

4. Берридж Н. Производство, очистка и свойства реннина.— Докл. на симп. по произв. и прим. ферм. пищ. пром. Лондон. Пер. и ред. Р. Фениксовой. Пищепромиздат, М., 1963, 65.

5. Бродская С. Влияние различных доз ультрафиолетового излучения на получение вариантов *Aspergillus nidulans*, образующих активные протеазы.— Микробиология, 1960, **29**, 358.

6. Бродская С. Влияние различных доз ультрафиолетового излучения на получение вариантов *Aspergillus*, образующих активные протеазы.— Тр. Ин-та микробиол. АН СССР, 1961, **1**, 470.

6а. Велицкая И. Ферментативная активность некоторых энтомопатогенных грибов.— Тр. Всесоюз. Ин-та защиты растений, 1963, 19, 187.

7. Вербина Н. О некоторых особенностях развития вариантов *Aspergillus nidulans*, полученных под влиянием ультрафиолетовых лучей.— Микробиология, 1958, **27**, 164.

8. Вербина Н. Накопление биомассы у сильно измененных вариантов *Aspergillus nidulans* при различных условиях культивирования.— Микробиология, 1959, **28**, 377.

9. Виноградова И., Платонова И., Петренко В. Новый способ получения протеолитических ферментов высокой активности из плесневого гриба *Aspergillus terricola*.— Микробиология, 1952, **21**, 692.

10. Виноградова И. Использование протеолитических ферментов плесневых грибов из рода *Aspergillus* и протеаз овсяного солода при изготовлении питательных сред. Канд. дисс. М., 1949.

11. Виноградова И. и др. Разработка стандартов на особые виды казеина для бактериологических целей. Использование грибной протеазы из глубинной культуры *Aspergillus terricola* для гидролиза казеина.— Сб. тр. по биохим. и физиол. микробов. Горький, 1961, 203.

12. Виноградова И. Использование протеолитических ферментов аспергиллов в производстве бактерийных препаратов.— В кн.: Внедр. ферм. преп. Ч. 2, М., 1961, 71.

13. Калашников Е., Трайнина Т. Плесневые грибы вида *Aspergillus flavus* как активные образователи протеолитических ферментов.— Тр. Ин-та микробиол. АН СССР, 1961, 10, 103.

14. Касаткина И. Биохимические мутанты *Aspergillus nidulans*, полученные после облучения ультрафиолетовыми лучами.— Микробиология, 1959, **28**, 807.

15. Кузюрина Л. Об устойчивости конидий *Aspergillus nidulans* и *Aspergillus niger* к ультрафиолетовым лучам.— Микробиология, 1959, **28**, 38.

16. Кузюрина Л., Морфологическая характеристика вариантов *Aspergillus nidulans*, полученных под влиянием различных доз ультрафиолетовых лучей. Получение мутантов у плесневых грибов с помощью ультрафиолетовых лучей.— Микробиология, 1959, **28**, 667.

17. Козловский Г. Ферментативное расщепление белков различных злаков.— В кн.: Внедр. ферм. преп. Ч. II, М., 1961, 62.

18. Кудряшов Ф. и др. Фибринолитические агенты, выделенные из культур некоторых сапрофитных грибов.— ДАН СССР, 1963, **153**, 939.

19. Логинова Л. Об активности ферментативного комплекса штамма *Aspergillus nidulans* и варианта, полученного с помощью ультрафиолетовых лучей.— Микробиология, 1960, **29**, 6.

20. Маттисон Н. Изучение окислительных и протеолитических ферментов *Penicillium chrysogenum*. Автореф. дисс. Л., 1956.

21. Маттисон Н. Применение протеолитических ферментов *Penicillium chrysogenum* G-176 в кожевенном производстве.— Тр. Ленингр. хим.-фарм. ин-та, 1960, 9, 233.

22. Панкратов Л. Использование протеолитических ферментов плес-

невых грибов из рода *Aspergillus* при изготовлении питательных сред в производстве биопрепаратов.— Тр. Ин-та микробиол. и вирусол. Изд-во АН Каз.ССР, Алма-Ата, 1958, 160.

23. Пантелеев Н. Питательные среды из ферментативных гидролизатов казеина в производстве альфа-туберкулина. Канд. дисс. Л., 1958.

24. Попова Н. Протеолитическая активность *Aspergillus oryzae* при глубинном культивировании на естественных и синтетических средах.— Тр. Центр. н.-и. ин-та спиртов. и ликеро-вод. пром., 1960, 9, 22.

26. Попова Н. Препараты протеолитических ферментов из поверхностной и глубинной культуры *Aspergillus terricola*.— В кн.: Внедрение ферм. преп. Сб. докл. на Всесоюз. конфер. Ч. 1. М., 1961, 48.

27. Попова Н. Влияние условий культивирования на образование протеолитических ферментов плесневыми грибами рода *Aspergillus*.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

28. Поверенный А. Некоторые представления о патогенетическом значении бактериальных протеиназ.— Сб. тр. по биохим. и физиол. микробов. Горький, 1961.

28а. Соловьев В. Перспективы применения протеолитических ферментов для повышения качества мяса.— В кн.: Внедрение ферм. Сб. докл. на Всесоюз. конфер. М., 1961.

29. Суханко Ф., Подгайная С. Расщепление белков ферментами *Fusarium avenaceum*.— Биохимия, 1951, **16**, 6; **23**, 186.

29а. Суханко Ф. Азотистое питание дерматомицетов и недерматомицетов. Автореф. докт. дисс. М., 1964.

30. Татаренко Е., Герасимова И., Терникова И. Изменчивость экспериментально полученных форм гриба *Aspergillus oryzae*.— Тр. Ин-та Микробиол. АН СССР, 1961, 10, 112.

31. Трайнина Т., Лифшиц Д., Калашников Е. Влияние качества пшеничных отрубей на амилолитическую активность ферментных препаратов.— Микробиология, 1961, **30**, 540.

32. Трайнина Т. Получение протеолитических ферментов плесневого гриба *Aspergillus flavus*.— В кн.: Внедрен. ферм. преп. Сб. докл. на Всесоюз. конфер. Ч. I. М., 1961, 56.

33. Томас Д. Коллагеназы и эластазы.— Докл. симп. произв. и прим. ферм. пищ. пром. Лондон, 1959. Пер. и ред. Р. Фениксовой. Пищепромиздат, М., 1963, 72.

34. Акацука Т., Сато М. Пептидазы *Aspergillus oryzae*. Гомогенность дипептидазы и аминополипептидазы при ультрацентрифугировании. Сравнение депептидазной и аминополипептидазной активности различных плесневых грибов.— РБЖ, 1964, 20Б175.— Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., 1960, 107; 1961, 67.

35. Bergkvist R. The proteolytic enzymes of *Aspergillus oryzae*. I. Methods for the estimation and isolation of the proteolytic enzymes.— Acta chem. Scand., 1963, 17, 1521; 1541.

36. Davies R. Microbial extracellular enzymes, their uses and some factors affecting their formation.— Biochem. Ind. Microorgan. Ed. C. Reinbow, A. Rose, Acad. Press. Ind., New York, 1963, 68.

37. Dhar S. C., Bose S. M. Studies on the essential groups of crystalline protease of *Aspergillus parasiticus*.— Enzymologia, 1962, **14**, 3, 155.

38. Gabeloteau C. et Desnuelle O. Sur l'activation du trypsinogène de boeuf par une protéinase cristallisée d'*Aspergillus saitoi*.— Biochem. et biophys. acta, 1960, 2, 230.

39. Ginsburg A., Schachman H. Studies on the enzymatic breakdown of proteins. I. Action of chymotrypsin on insulin.— J. Biol. Chem., 1960, 235, 108; 115.

39а. Hofman T. Activation of trypsinogen by *Penicillium kinase*.— Biochem. J., 1960, 74, 411.

39б. Hofman T., Shaw R. Proteolytic enzymes of *Penicillium janthinellum*. 1. Purification and properties of A trypsinogen activating enzyme (peptidase A).— Biochem. et Biophys. Acta. Enzym. Ser., 1964, **92**, 543.

40. Horace J., Ştafanini M. Fibriolysis. III. Nutritional and environmental requirements for optimum production of fibrinolysin from *Aspergillus* (Aspergillin O).— Proc. Soc. Exper. Biol., New York, 1959, **102**, 201.

41. Imamura Tsuneaki. Studies on the changes of milk protein by *Penicillium rogueforti*. 1. Breakdown of aminoacids by extract. (Summary).— Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 1960, **24**, 7, A79; **34**, 11, 892.

42. Кисида Тадааки, Иосимура Садахико. Изучение протеиназы *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. III. Идентификация N—UC-концевых аминокислот,— РБЖ, 1963, 13Б191 Sci. Repts. Hyogo Univ. Agric. Ser. Agric. Chem., 1961, 5, 1, 97.

43. Leal J., Larcia A., Villanueva J. Proteolytic activity of growth media filtrates from non-pathogenic species of Verticillium.— Nature. Ind., 1963, **200**, 290.

44. Martin S. M. et al. The specifity of a protease from Penicillium cyaneo-fulvum.— Canad. J. Biochem. a. Physiol., 1962, **40**, 237.

45. Meyer E., Knight S. Studies on the nutrition of *Penicillium rogueforti*.— Appl. Microbiol., 1958, **6**, 174.

46. Мияке Сугуру, Иосимура Садахико, Кисида Тадааки. Сравнительное исследование кристаллических протеиназ *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium chrysogenum*, *Scopulariopsis brevicaulis*.— Sci. Repts. Hyogo Univ. Agric. Ser. Agric. Chem., 1960, 4, 126; 1961, 5, 97.

47. Mazusima K., Sinada K. Studies of proteolytic enzymes of mould fungi.— J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1962, **36**, 193.

48. Nakanishi K. Trypsinogen-kinase in *Aspergillus niger*.— Biochem., 1959, **46**, 1553.

48a. Oda Kinichiro. Genetic and biochemical studies on the formation of protease in *Aspergillus sojae*. II. Biochemical studies.— Agric. a. Biol. Chem., 1963, **27**, 767.

49. Serlupi-Crescenzi G. Osservazioni sul sistema proteolitico del *Penicillium chrysogenum*.— Rend Inst. super sanita, 1962, **25**, 265.

49a. Shaw R. Proteolytic enzymes of *Penicillium janthinellum*. II. Properties of peptidase B.— Biochem. et Biophys. Acta. Enzymol. Sub., 1964, **92**, 558.

50. Singh K., Martin S. Purification and properties of a protease from *Penicillium cyaneo-fulvum*.— Bacteriol. Proc. Soc. Amer. Bacteriologists, 1960, **51**, 60.

51. Takamu. Изучение физиологии аспергиллов, в особенности брожения и роста. II. Зависимость между величиной осмотического давления и образованием протеиназы и амилазы у *Aspergillus awamori*.— РБЖ, 1961, 21Б, 210. Bot. Mag. Tokyo, 1960, **73**, 862, 156.

52. Waksman S., Starkey B. The decomposition of proteins by microorganisms with particular reference to purified vegetable proteins.— J. Bacteriol., 1932, 23, 405.

53. Yoshida F., Nagasava M. Studies on the proteolytic enzymes of black Aspergilli.— Proc. Int. Symp. Enzymic Chem. Tokyo a. Kyoto, 1957, 504.

ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

Глюкозооксидазы катализируют окисление глюкозы молекулярным кислородом с образованием глюконовой кислоты как конечного продукта. В качестве промежуточных соединений образуется глюконо-δ-лактон, который может быть обнаружен в среде вместе со свободной кислотой и спонтанно превра-

щается в глюконовую кислоту. Установлено значительное число видов грибов, при определенных условиях культивирования образующих фермент глюкозооксидазу. К ним относятся: *Asp. niger, Pen. notatum, Pen. chrysogenum, Pen. vitale, Pen. amagasakiense,* изученные довольно подробно, а также ряд видов пенициллов, свойства глюкозооксидаз которых почти не исследованы [9].

Прямое окисление глюкозы с образованием глюконовой кислоты является, по-видимому, широко распространенным, но мало изученным процессом у грибов. Впервые фермент был открыт у *Asp. niger* Максимовым в экстракте из мицелия гриба *Asp. niger* [9], затем более подробно изучен Мюллером [38—40]. В 40-х годах фермент обнаружен как второй антибиотик в культуральной жидкости *Pen. notatum* при биосинтезе пенициллина и был выделен и изучен рядом авторов [32, 35, 43]. Было установлено, что выделенные препараты глюкозооксидазы — нотатин, пенициллин В, пенатин — обладают антибиотическими свойствами по отношению к широкому кругу бактерий. В опытах in vitro обнаружено, что для проявления антибактериальной активности необходимо наличие глюкозы, свободного кислорода. Механизм антибактериальной активности глюкозооксидаз объяснялся действием перекиси водорода, образуемой при окислении глюкозы.

Кейлин и Гартре [34] получили высокоочищенные препараты фермента из *Pen. notatum* и установили, что глюкозооксидаза является флавопротеиновым ферментом с двумя флавин-аденин-динуклеотидными группами в молекуле. Простетическая группа фермента представляет аллоксазиноаденино-динуклеотид (рибофлавино-фосфат-фосфат-рибозо-аденин), называемый флавин-аденин-нуклеотидом. Реакция окисления β-d-глюкозы, катализируемая глюкозооксидазой, протекает по схеме: $R—COH + O_2 + H_2O \longrightarrow RCOOH + H_2O_2$ (рис. 30).

Фермент осуществляет перенос водорода глюкозы к газообразному кислороду через флавопротеин, т. е. он является по существу дегидрогеназой, но первое название — глюкозооксидаза — более прочно вошло в литературу и стало более привычным.

Пидопличко и Билай описали новый вид пенициллa — продуцента глюкозооксидазы — *Penicillium vitale* Pid. et Bil., и коллективом авторов были разработаны условия культивирования, метод изоляции и получения высокоочищенных активных препаратов фермента [25—27]. В нативном виде при стерилизации через каолиновые бактериологические фильтры препарат под названием микроцид нашел широкое применение в медицинской практике в качестве наружного средства при различных гнойнохирургических заболеваниях. Новый вид *Pen. vitale* оказался наиболее активным и специфичным из значительного

числа изученных других видов пенициллов. Глюкозооксидаза из *Pen. vitale* обладает широким спектром антибактериального действия в отношении грамположительных, грамотрицательных, пенициллиноустойчивых и устойчивых к другим антибиотикам бактерий [9].

При поверхностном методе культивирования гриб выращивается на синтетической среде с глюкозой или сахарозой. Наи-

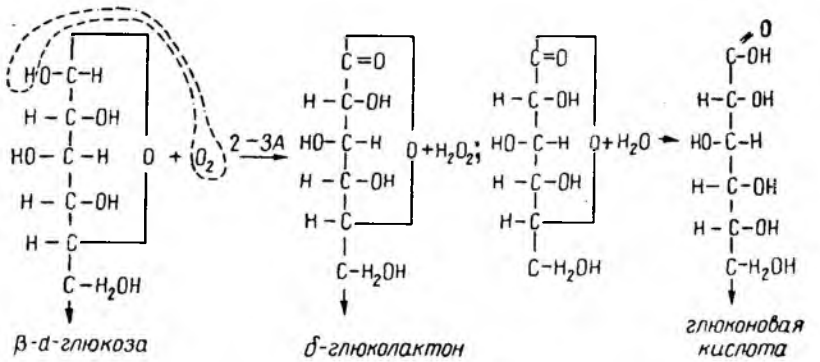


Рис. 30. Схема окисления β-d-глюкозы глюкозооксидазой.

большая антибактериальная и ферментативная активность культуральной жидкости *Pen. vitale* совпадает с подкислением ее до pH 3,3—3,4 и периодом максимального роста мицелия, использования азота и глюкозы.

Pen. vitale обладает не только глюкозооксидазной, но и значительной инвертазной активностью; при росте на среде с сахарозой последняя инвертируется полностью на третий день роста гриба. Было выяснено значение количественного соотношения источников углерода и азота в среде и их абсолютного содержания для роста и максимальной антибиотической и ферментативной активности культуральной жидкости, а также конидиеобразования и направленности других процессов метаболизма гриба (табл. 27, 28). В зависимости от соотношения источников углерода и азота в среде и их абсолютного содержания глюкозооксидазная и антибактериальная активность *Pen. vitale* могут не проявляться; при этом обычно сильно пигментируется культуральная жидкость, повышается ее pH, активно образуется каталаза. При повышенном содержании источников углерода и азота отмечается высокая глюкозооксидазная и антибактериальная активность культуральной жидкости при низком pH ее, отсутствии каталазы, пигментации и конидиеобразования. Исходя из этого принципа, разработаны условия культивирования *Pen. vitale* с целью получения микроцида или глюкозооксидазы.

Таблица 27

Накопление биомассы *Pen. vitale* и изменение pH на средах с различным соотношением источников углерода и азота

Концентрация глюкозы, *г/л*	Количество KNO_3, *г/л*									
	1		3		5		10		15	
	Вес мицелия, *мг*									
10	160		130		115		125		160	
30	225		315		335		330		325	
60	340		670		645		520		470	
100	320		615		750		700		800	
	Исходное pH	Конечное pH	Исходное pH	Конечное pH	Исходное pH	Конечное pH	Исходное pH	Конечное pH	Исходное pH	Конечное pH
10	5,09	7,00	4,84	8,0	4,92	8,0	4,92	8,0	4,92	7,28
30	5,44	3,28	5,09	6,88	5,19	5.09	5,01	7,27	5,09	7.35
60	4,84	3,24	4,84	3,63	4,84	4,40	4,80	6,13	4,82	6,28
100	4,85	3,47	4,67	3,01	4,86	3.53	4,72	3,8	5,01	5,31

Метод получения очищенных и кристаллических препаратов глюкозооксидазы из культуральной жидкости *Pen. vitale* основан на первоначальной адсорбции фермента безводной окисью алюминия. Очистка включает такие процедуры [6, 8, 9]:

I. Адсорбция безводной окисью алюминия из культуральной жидкости (pH доводится до 6,8—7,0).

II. Трехкратная элюция хлористым аммонием: 1,9% на 0,3 М KH_2PO_4, вторая и третья — 4,5% раствором хлористого аммония на 0,15 М KH_2PO_4. Объем элюатов составляет 1/10—1/20 часть исходного объема культуральной жидкости.

III. Осаждение двойным объемом этилового спирта и центрифугирование осадка. Обе процедуры производятся на холоду.

IV. Перевод осадка глюкозооксидазы в водный раствор и повторное осаждение и переосаждение ацетоном, затем получение препарата из водного раствора лиофильной сушкой.

V. Кристаллический фермент получается из водных растворов очищенной глюкозооксидазы осаждением ее сульфатом аммония при 52—55% его насыщения.

При соблюдении указанных условий выделения и очистки препарата выход фермента из культуральной жидкости селекционированного штамма *Pen. vitale* составлял 60—100 *мг/л* (соответственно 60—90 *мг* белка на 1 *л*) [9].

Как видно из приведенной выше схемы реакции, первым продуктом окисления β-d-глюкозы является δ-глюколактон [30]. Отмечено, что при окислении глюкозы очищенными препара-

Таблица 28

Влияние различной концентрации глюкозы и соотношения ее с источником азота в среде на антибактериальную и

Концентрация глюкозы, *г/л*	Концентрация			
	1		3	
	Титр	Наличие каталазы	Титр	Наличие каталазы
10	0	++++++	0	++++++
30	1/50	0	1/1000	+++
60	1/10	0	1/100	0
100	1/10	0	1/100	0
10	302,4		0	
30	210,9		2612,2	
60	0		196.7	
100	0		41,05	

* Количество *мл* O_2 на 1 *мл* культуральной жидкости за 30 *мин.*

тами глюкозооксидазы в фосфатном буфере в начале опыта образуется незначительное по сравнению с общей глюконовой кислотой количество свободной глюконовой кислоты. Прибавление к инкубационной смеси δ-лактона глюконовой кислоты снижает потребление кислорода, особенно в первые минуты после его добавления. По мере превращения δ-лактона в глюконовую кислоту потребление кислорода повышается [14, 16, 17]. В этой связи Диденко [17] и Гулым, Шур-Шультц и Дегтярь [7] были получены весьма ценные данные, свидетельствующие о том, что добавление δ-лактона глюконовой кислоты, снижая поглощение кислорода ферментом из *Pen. vitale,* вызывает значительное повышение антибактериальной активности как нативного, так и очищенных препаратов глюкозооксидазы. Эти данные представляют особый интерес, так как они позволяют, по-видимому, считать, что антибактериальное действие глюкозооксидаз может быть связано с δ-глюколактоном. Возможно образование δ-глюколактона на первых фазах метаболизма *Pen. vitale,* а также *Pen. chrysogenum, Pen. notatum* находится в связи с биосинтезом пенициллина (рис. 31).

Монахов и Нейфах, изучавшие глюкозооксидазу из *Pen. vitale* не разделяют мнения, согласно которому антибактериальная активность фермента обусловлена только образуемой перекисью водорода [21]. Увеличение антибактериального действия глюкозооксидазы *Pen. vitale* в присутствии определенных количеств $CaCl_2$ объясняют стабилизирующим действием его на δ-лактон глюконовой кислоты [7, 16, 17].

ферментативную * активность *Pen. vitale* 1312/140

KNO_3, *г/л*					
5		10		15	
Титр	Наличие каталазы	Титр	Наличие каталазы	Титр	Наличие каталазы
0	+++++	0	+++	0	++++
1/1000	++++	1/700	++	1/70	+++
1/700	+	1/8000	++	1/8000	+++
1/8000	0	1/16000	0	1/20000	++
0		0		0	
1894,3		3243		1903	
2470		4096,0		3057,0	
6529,2		7779,5		4090,9	

Кристаллические препараты из *Pen. vitale,* полученные Гулым и Дегтярь [9], были гомогенны при осаждении в ультрацентрифуге и электрофорезе; коэффициент седиментации их $S_{2010}=7{,}80$ ($7{,}80—10^{-13}$). Их растворы дают характерный спектр поглощения с тремя максимумами (276—280 *ммк,* 380 *ммк* и 460—465 *ммк*), обладают ферментативной активностью $Q_{O2}=186\,000—200\,000$. Очищенная и кристаллическая глюкозооксидаза имеют оптимум pH 5,8. Она стабильна при подогревании до 50° С в течение 15 *мин* при pH 4,0; при 60° С активность снижается на 33%, а дальнейшее повышение температуры вызывает резкое падение активности [14]. Очищенные препараты глюкозооксидазы стабильны при длительном хранении. Изучен ряд других физико-химических и биологических свойств глюкозооксидазы из *Pen. vitale* [9] (рис. 32).

Одним из интересных и, несомненно, имеющих практическое значение для лечебной медицины свойств глюкозооксидазы *Pen. vitale* является высокая антибактериальная активность, отсутствие устойчивости к действию фермента среди патогенных, в том числе резистентных к другим антибиотикам, бактерий. Никольская [23, 24] установила, что пенициллиноустойчивые стафилококки значительно более чувствительны к микроциду и очищенной глюкозооксидазе, что особенно проявляется при комбинированном испытании вместе с пенициллином (табл. 29—31). Как видно из приведенных данных, и микроцид (нативная глюкозооксидаза) и очищенные препараты глюкозооксидазы *Pen. vitale* проявляют высокую антибактериальную актив-

Таблица 29

Сравнительное изучение эффективности действия микроцида и пенициллина, взятых вместе и раздельно, на *Staph. aureus* 209 и пенициллиноустойчивый стафилококк *Staph. aureus* 209 Р*

Антибиотики	*Staph. aureus* 209		*Staph. aureus* 209 Р	
	БС	БЦ	БС	БЦ
Микроцид+пенициллин 200 *ед/мл*	1 : 50 000	1 : 24 000	1 : 64 000	1 : 50 000
Микроцид+пенициллин 1000 *ед/мл*	1 : 32 000	1 : 20 000	1 : 50 000	1 : 24 000
Микроцид+пенициллин 500 *ед/мл*	1 : 20 000	1 : 16 000	1 : 40 000	1 : 32 000
Микроцид+физиологический раствор	1 : 16 000	1 : 10 000	1 : 32 000	1 : 16 000
Пенициллин 200 *ед/мл*+физиологический раствор	1 : 32 000	1 : 16 000	0	0
Пенициллин 1000 *ед/мл*+физиологический раствор	1 : 16 000	1 : 10 000	0	0
Пенициллин 500 *ед/мл*+физиологический раствор	1 : 10 000	1 : 4 000	0	0

Условные обозначения 0 — отсутствие задержки роста стафилококка; БС — бактериостатическое действие; БЦ — бактерицидное действие.

* Пенициллиноустойчивый стафилококк (штамм 209 Р) с минимальной чувствительностью к пенициллину 4000 *ед/мл*.

ность по отношению к стафилококкам. При этом чувствительность к пенициллину или другим антибиотикам не ниже, а иногда и выше чувствительности к глюкозооксидазе *Pen. vitale* устойчивых стафилококков.

Дегтярь изучила влияние глюкозооксидазы *Pen. vitale* (микроцида) на некоторые стороны обмена веществ здорового организма [9, 12, 13]. Автор установила, что внутривенное введение глюкозооксидазы (активность до 100 000 Q_{O_2}) в дозе до 20 *мг/кг* веса не является смертельным для кроликов, но такие же дозы при внутримышечном введении вызывают их гибель. Максимальное падение уровня сахара в крови наступает через 10 *мин* после введения. Максимальное падение уровня сахара в крови наступает через 10 *мин* после введения, а затем через 40—45 *мин* он возвращается к исходному. Содержание метагемоглобина максимально увеличивается через 20—30 *мин* после введения и снижается до исходного через 2—3 *час*. Максимальное падение кислородной емкости крови наблюдается через 20—45 *мин* после введения, а восстановление до исходной — через 3—4 *час*.

Что касается распределения глюкозооксидазы в органах, то автор установила, что как в крови, так и в органах, кроме печени, она отмечается в течение 1—3 *час;* в печени в значительном количестве сохраняется до 7—12 *час*. При этом установлено, что фермент инактивируется гомогенатами ткани печени и экстрактами из них.

Таблица 30

Антибиотическое действие очищенных препаратов глюкозооксидазы на стафилококки, чувствительные и устойчивые к ряду антибиотиков

Тест-микроорганизм и его характеристика	Разведение глюкозооксидазы, задерживающее рост стафилококков	
	БС Титр (количество препарата в *мкг*)	БЦ Титр (количество препарата в *мкг*)
Staph. aureus 209 (чувствительный к пенициллину)	1 : 80 000 000 (0,012 *мкг*)	1 : 40 000 000 (0,025 *мкг*)
Staph. aureus 209 Р (устойчивый к пенициллину 3000 *ед/мл*)	1 : 80 000 000 (0,012 *мкг*)	1 : 20 000 000 (0,05 *мкг*)
Staph. aureus 209 (устойчивый к стрептомицину 1000 *ед/мл*)	1 : 80 000 000 (0,012 *мкг*)	1 : 40 000 000 (0,025 *мкг*)
Staph. aureus 209 (устойчивый к эритромицину 100 *ед/мл*)	1 : 40 000 000 (0,025 *мкг*)	1 : 20 000 000 (0,05 *мкг*)
Staph. aureus 209 (устойчивый к тетрациклину 50 *ед/мл*)	1 : 80 000 000 (0,012 *мкг*)	1 : 80 000 000 (0,012 *мкг*)
Staph. aureus 209 (устойчивый к новобиомицину 200 *ед/мл*)	1 : 160 00 000 (0,006 *мкг*)	1 : 80 000 000 (0,012 *мкг*)

Таблица 31

Антибиотическое действие очищенных препаратов глюкозооксидазы на стафилококки, устойчивые к нескольким антибиотикам

Тест-микроорганизм и его характеристика	Разведение глюкозооксидазы, задерживающее рост стафилококков	
	БС Титр (количество препарата в *мкг*)	БЦ Титр (количество препарата в *мкг*)
Staph. aureus (устойчивый к пенициллину 100 *ед/мл*, стрептомицину 10 *ед/мл*, левомицетину 100 *ед/мл*, биомицену 100 *ед/мл*)	1 : 200 000 000 (0,05 *мкг*)	1 : 20 000 000 (0,05 *мкг*)
Staph. aureus (устойчивый к стрептомицину 2000 *ед/мл*, левомицетину 2000 *ед/мл*, биомицину 200 *ед/мл*, мицерину 200 *ед/мл*, мицерину 2000 *ед/мл*, полимиксину свыше 2000 *ед/мл*; чувствительный к пенициллину)	1 : 80 000 000 (0,012 *мкг*)	1 : 40 000 000 (0,025 *мкг*)
Staph. aureus (устойчивый к стрептомицину свыше 2000 *ед/мл*, к пенициллину, левомицетину, биомицину, мицерину, полимиксину)	1 : 40 000 000 (0,025 *мкг*)	1 : 20 000 000 (0,05 *мкг*)
Staph. aureus (устойчивый к стрептомицину 2000 *ед/мл*, левомицетину 200 *ед/мл*, биомицитину 2000 *ед/мл*; пенициллину 2000 *ед/мл*; чувствительный к мицерину)	1 : 20 000 000 (0,05 *мкг*)	1 : 10 000 000 (0,1 *мкг*)
Staph. aureus (устойчивый к пенициллину 200 *ед/мл*, стрептомицину 2000 *ед/мл*, левомицетину 200 *ед/мл*, мицерину 200 *ед/мл*, полимиксину выше 2000 *ед/мл*)	1 : 80 000 000 (0,012 *мкг*)	1 : 80 000 000 (0,012 *мкг*)

Середа [28] показал, что глюкозооксидаза *Pen. vitale* не изменяет активности в присутствии высокоочищенных тканевых белков (альдолазы, дегидрогеназы α-глицерофосфорной кислоты и др.), их гидролизатов или определенных концентраций мочевины.

Приведенные данные дают основание предполагать, что при дальнейшем изучении область применения глюкозооксидазы в качестве лечебного средства может быть расширена.

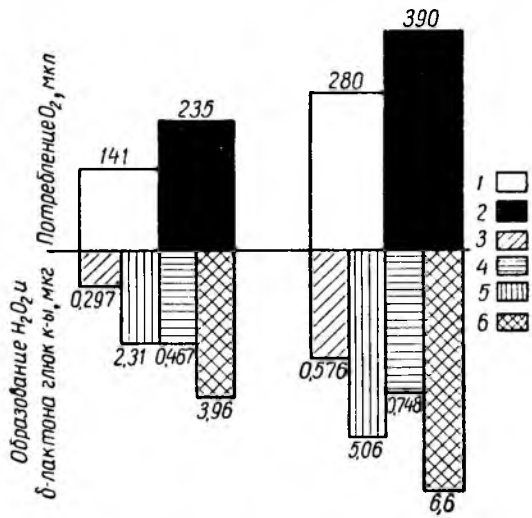


Рис. 31. Влияние $CaCl_2$ (0,0064—0,128 М) на активность глюкозооксидазы *Pen. vitale* (потребление кислорода, образование H_2O_2 и δ-лактоноглюконовой кислоты) (по Диденко):

1 — потребление O_2 в контроле; *2* — потребление O_2 в присутствии $CaCl_2$; *3* — H_2O_2 в контроле; *4* — H_2O_2 в присутствии $CaCl_2$; *5* — δ-лактон глюконовой кислоты в контроле: *6* — δ-лактон глюконовой кислоты в присутствии $CaCl_2$.

Андеркофлер [1] с целью применения в пищевой промышленности получил глюкозооксидазу из мицелия *Asp. niger,* выращенного глубинным способом. Препарат содержал примесь каталазы. Условия образования, выделения и очистки не описаны, так как запатентованы рядом фирм США. Очищенные препараты фермента не стабильны.

Японскими авторами [36, 37] разработан метод получения, изоляции и очистки фермента глюкозооксидазы из нового вида гриба *Pen. amagasakiense,* а также получен кристаллический препарат и изучены его свойства. Кусаи с сотрудниками изучили свыше 1200 культур грибов, выделенных из разных природных субстратов. Выделенный новый вид гриба в опытах

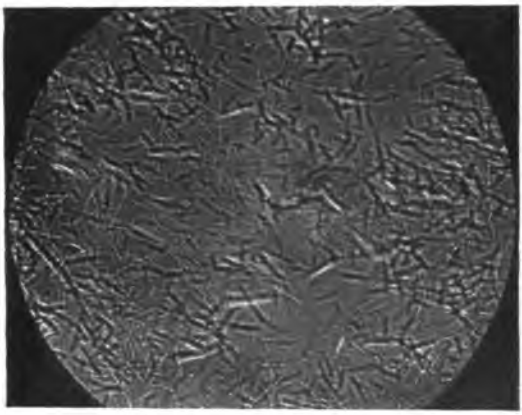


Рис. 32. Кристаллы глюкозооксидазы *Pen. vitale* (650х) (по Гулому, Дегтярь)

авторов выращивался на среде Чапека с 4,5% сахарозы; максимальная активность при pH культуральной жидкости — 5,5—6,0.

В общих чертах метод выделения и очистки глюкозооксидазы из *Pen. amagasakiense* основан на трехкратной адсорбции его из культуральной жидкости и диализованных водных растворов на колонках с разными смолами и элюцией 0,1-н. аммоний-ацетатным буфером при pH 6,5 с первой колонки, при pH 4,5 и 5,0 со второй колонки и 0,05-н. аммоний-ацетатным буфером, pH 5,0 с третьей колонки.

Последний элюат содержит главные активные фракции фермента, получаемые путем высаливания раствором сульфата аммония до 80% насыщения. Кристаллическая глюкозооксидаза получается из водного раствора очищенного фермента насыщением его сульфатом аммония до получения первой мути, после чего через один-два дня при хранении на холоду выпадают кристаллы. Препарат гомогенен, и его раствор давал три характерных максимума спектра адсорбции — 278, 370 и 460 *ммк*. Константа седиментации равна 7,93 (10 *сек*). Авторы определили молекулярный вес глюкозооксидазы — 154 000; установили, что в молекуле фермента имеется две молекулы ФАД. Изучен ряд других свойств препарата, в частности влияние ряда веществ, ферментных ядов на активность глюкозооксидазы *Pen. amagasakiense*.

Мунк, Пашкова, Ганус [5, 41] изучили условия образования глюкозооксидазы штаммом *Asp. niger* K_{10} на синтетической среде при глубинном методе культивирования.

В опытах авторов гриб выращивался на качалке в колбах емкостью 500 *мл* с 70 *мл* питательной среды при засеве ее 0,1% (по объему) взвесью конидий. Среда следующего состава (по Миллеру): 5% глюкозы; 0,075% лимонной кислоты; 0,2% $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; 0,025% KH_2PO_4; 0,025% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,025% KCl; 0,001% $FeCl_3$ (или $FeSO_4 \cdot 7H_2O$), исходное pH среды перед стерилизацией — 5—5,2. Фермент изолировался из мицелия.

Глюкозооксидазная активность, по данным авторов, была значительно более высокая при глубинном культивировании. Наблюдались три основные фазы метаболизма гриба при биосинтезе фермента глюкозооксидазы *Asp. niger* K_{10}. Первая фаза (через 16 *час* ферментации) — снижение количества сахаров в среде, снижение pH с 5 до 3,5, слабое повышение титруемой кислотности, начало увеличения биомассы мицелия. Вторая фаза (через 16—32 *час*) — быстрое нарастание глюкозооксидазной активности с максимумом между 24 и 30 *час*. Третья фаза (через 32—36 до 72 *час*) — угнетение глюкозооксидазной активности через 48 *час* до 50% по сравнению со второй фазой с одновременным повышением роста мицелия, быстрым снижением концентрации сахаров и титруемой кислотности, снише-

нием pH. После 48 *час* отмечается наличие также лимонной кислоты.

Авторами изучено влияние на повышение активности образования глюкозооксидазы грибом *Asp. niger* K_{10} различных компонентов среды — концентрации глюкозы (1—10%), лимонной кислоты, азотнокислого кальция и других источников азота, минеральных солей, pH среды. Для культивирования *Asp. niger* K_{10} при биосинтезе глюкозооксидазы рекомендована видоизмененная среда следующего состава: глюкозы — 5%, лимонной кислоты — 0,075%; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$—1%; KH_2PO_4—0,1%; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$—0,001%; исходное pH 4,0. На этой среде отмечен лучший рост мицелия гриба и наиболее высокая ферментативная активность его.

Применение глюкозооксидазы. В качестве лечебного антибиотического препарата под названием «микроцид» нативная глюкозооксидаза из *Pen. vitale* примерно с 50-х годов применяется в медицинской практике. Микроцид показан к применению при лечении свежих и инфицированных ран, ожогов второй и третьей степени, обморожений второй и третьей степени и других гнойно-воспалительных процессов кожи и слизистых оболочек. Обладая широким антибактериальным спектром и высокой активностью, а также свойством стимулировать заживление ран, микроцид проявляет высокую лечебную эффективность в хирургии, стоматологии, отоларингологии и других областях лечебной медицины *.

В последние годы возник интерес к практическому использованию глюкозооксидазы в клинической медицинской практике в качестве специфического реактива для определения глюкозы в крови, моче и других жидкостях организма, а также с некоторыми диагностическими целями, в частности при диагностике некоторых форм злокачественных опухолей. В отечественной литературе этим вопросам посвящены работы Лукомской и Городецкого [18, 19], Нейфаха и Монахова [21, 22], Михайлова [20], Гоникман [11].

Кроме этого, практическое применение фермент глюкозооксидаза находит в различных отраслях пищевой промышленности, где она используется в качестве антиоксиданта.

Вопросы применения глюкозооксидазы в значительной степени нашли отражение в сборнике трудов симпозиума, посвященного вопросам производства и применения этого фермента [1965].

---

* Данные о применении микроцида обобщены в ряде монографий: Антибиотик-микроцид. Изд-во АН УССР, К., 1953; Лечебный препарат микроцид и его применение, Изд-во АН УССР, К., 1950; Микроцид и его применение. Изд-во АН УССР, К., 1955; Гулый М., Билай В., Пидопличко М., Дегтярь Р., Никольская Е. Фермент глюкозооксидаза и его применение. Изд-во «Наукова думка», К., 1964.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андеркофлер Л. Глюкозооксидаза, ее производство, свойства и возможные способы применения.— Докл. симп. о произв. ферм. пищ. пром. Пер. и ред. Р. Фениксовой. Пищепромиздат, М., 1963, 73.

2. Билай В., Пидопличко Н. К характеристике антибактериальных глюкозидаз видов рода *Penicillium*.— В кн.: Антибиотик микроцид. Изд-во АН УССР, К., 1953.

3. Билай В., Пидопличко Н. О некоторых итогах и дальнейших задачах внедрения микроцида в медицинскую практику.— В кн.: Микроцид и его применение. Изд-во АН УССР, К., 1955, 5.

4. Билай В., Пидопличко Н. Влияние соотношения азота и углерода в среде на направленность процессов метаболизма гриба *Penicillium vitale* Pidopl. et Bilai, продуцента глюкозооксидазы.— Тез. докл. I Всесоюз. биохим. съезда. Изд-во АН СССР, М.—Л., 1963, 1, 7.

5. Ганус Я., Мунк В. Очистка глюкозооксидазы на диэтиламиноэтилцеллюлозе.— Тез. докл. V Междунар. биохим. конгр. М., 1961, **1**, 5, 42, 245.

6. Гулый М., Дегтярь Р. Производственный метод получения высокоочищенного сухого микроцида.— В кн.: Антибиотик микроцид. Изд-во АН УССР, К., 1953, 72.

7. Гулый М., Шур-Шультц В., Дегтярь Р. К механизму антибактериального действия микроцида. В кн.: Антибиотик микроцид. Изд-во АН УССР, К., 1963, 131.

8. Гулий М., Дегтяр Р. Виробничий метод очистки, кристалізація та деякі властивості глюкозооксидази з гриба *Penicillium vitale* Pidopl. et Bilai.— Укр. біохім. ж., 1962, **34**, 137.

9. Гулый М., Дегтярь Р. Очистка и кристаллизация глюкозооксидазы из гриба *Penicillium vitale* Pidopl et Bilai.— ДАН СССР, 1962, **145**, 209.

10. Гулый М., Билай В., Пидопличко Н., Дегтярь Р., Никольская Е. Фермент глюкозооксидаза и его применение. Изд-во «Наукова думка», К., 1964.

11. Гоникман Э. Гексокиназа сыворотки крови при злокачественных новообразованиях.— Тез. докл. I Всесоюз. биохим. съезда. Изд-во АН СССР. М.—Л., 1963, 2, 240.

12. Дегтярь Р. Влияние очищенных препаратов микроцида на обмен веществ здорового животного организма. Канд. дисс., М., 1952.

13. Дегтярь Р. Влияние очищенных препаратов микроцида на обмен веществ здорового животного организма. I. Влияние очищенных препаратов микроцида на содержание сахара в крови, образование метгемоглобина и кислородную емкость крови. II. Распределение микроцида в животном организме. III. Влияние очищенных препаратов микроцида на дыхание печеночной ткани.— В кн.: Антибиотик микроцид. Изд-во АН УССР, К., 1953, 78; 100.

14. Дегтярь Р. О. О некоторых свойствах кристаллических очищенных препаратов глюкозооксидазы из *Penicillium vitale*.— Тез. докл. I биохим. съезда. Изд-во АН СССР, М.—Л., 1963, 1, 100.

15. Диденко Г. Изучение биологической активности микроцида.— В кн.: Антибиотик микроцид. Изд-во АН УССР, К., 1953, 109.

16. Диденко Г. Изучение параллелизма между ферментативной и антибактериальной активностью микроцида.— В кн.: Антибиотик микроцид. Изд-во АН УССР, К., 1953, 117.

17. Диденко Г. Образование лактона глюконовой кислоты при окислении глюкозы микроцидом и его антибиотические свойства.— В кн.: Антибиотик микроцид. Изд-во АН УССР, К., 1963, 125.

18. Лукомская И., Городецкий В. Применение микроцида (глюкозооксидазы) для специфического количественного определения глюкозы в крови.— Вопр. мед. химии, 1960, **6**, 641.

19. Лукомская И., Городецкий В. Применение микроцида (глюкозооксидазы) для определения глюкозы в крови и при диабете.— Биохимия, 1961, **26**, 477.

20. Михайлов В. Активность гексокиназы сыворотки крови при некоторых заболеваниях системы крови у детей.— Тез. докл. I биохим. съезда. Изд-во АН СССР, М.—Л., 1963, 2, 258.

21. Монахов Н., Нейфах С. Об идентичности глюкозооксидазы и микроцида из нового вида *Penicillium vitale*.— Биохимия, 1962, **27**, 495.

22. Нейфах С., Монахов И., Кисина Ж. Корреляция между активностью гексокиназы в сыворотке крови и злокачественными опухолями у человека.— Вопр. онкол. 1963, **9**, 68.

23. Никольская Е., Лебедева Т. К характеристике глюкозооксидазной активности *Penicillium vitale* Pidopl. et Bilai.— Тез. докл. I Всесоюз. биохим. съезда. Изд-во АН СССР, М.—Л., 1963, 2, 181.

24. Нікольська О., Дегтяр Р. Одержання глюкозооксидази в *Penicillium vitale* Pidopl. et Bilai.— Мікробіол. ж. 1964, **26**, 48.

25. Пидопличко Н., Билай В. О лечебном антибиотическом препарате микроцинде.— В кн.: Лечебный препарат микроцид и его применение. Изд-во АН УССР, К., 1950, 5.

26. Пидопличко Н., Билай В. Лечебный антибиотический препарат микроцид.— В кн.: Антибиотик микроцид. Изд-во АН УССР, К., 1953, 5.

27. Пидопличко Н., Билай В. О продуценте микроцида — *Penicillium vitale* Pidopl. et Bilai.— В кн.: Антибиотик микроцид. Изд-во АН УССР, К., 1953, 32.

28. Середа А. О взаимодействии глюкозооксидазы и дегидрогеназы α-глицеринфосфорной кислоты с тканевыми белками и продуктами их гидролиза.— Укр. біохім. ж., 1963, **25**, 669.

29. Покровская Н., Новакова Л., Финогенова Т. Образование глюкозооксидазы некоторыми плесневыми грибами.— Микробиология, 1962, **31**, 788.

30. Bentley R., Neuberger A. The mechanism of the action of notatin.— Biochem. J., 1949, **45**, 584.

31. Bruggen J. et al. Penicillin B. Preparation, purification, and mode of action.— J. Biol. Chem., 1943, 365.

32. Coulthard C. et al. Notatin: an antibacterial glucose-aerodehydrogenase from *Penicillium notatum* and *Penicillium restriculosum* sp. nov.— Bioch. J., 1945, **39**, 24.

33. Keilin D., Hartree E. Properties of glucose oxidase. (Notatin).— Biochem. J., 1948, **42**, 221.

34. Keilin D., Hartree E. Prosthetic group of glucose oxidase. (Notatin).— Nature, 1946, **157**, 3998, 801.

35. Kochaloty W. Purification and properties of penatin. The second antibacterial substance produced by *Penicillium notatum* Westling.— Arch. Biochem., 1943, 2, 73.

36. Kusai K. et al. Crystallization of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*.— J. Biochim. Biophys., 1960, **40**, 555.

37. Kusai K. Crystalline glucose oxidase.— Ann. Rep. Sci. Works. Fac. Sci. Osaka Univ. 1960, **8**, 43.

38. Müller D. Studien über neues enzym Glukoseoxydase. I.— Biochem. Zs., 1928, **199**, 136.

39. Müller D. Mitteilung. Glukoseoxydase aus *Aspergillus niger*. Verhalten gegen Disaccharide (Maltoseoxydase), Glukuronsäure und Athylalkohol. Versuche mit Methylenblau und Monojodessigsäure.—Biochem. Zs., 1931, **232**, 423.

40. Müller D. Über die Glucosedehydrasen.— Enzymologie, 1941, **10**, 40.

41. Munk V., Paskova S., Hanus S. Glucose oxidase of *Aspergillus niger*. I. Factors influencing glucose oxidase activity in submerged cultivation of *Aspergillus niger* on synthetic medium. Formation of heterokaryotic mycelium in Asp. niger.— Folia Microbiologica, 1963, 8, 203; 378.

42. Panek A. Detection of enzymes by paper chromatography.— J. Chromatogr., 1959, 2, 566.
43. Proszt G. Nagy glukózoxidáz aktivitasu penészgombák. kiválasztása és optimális tenyésztési faltételeik megállapitása.— Elelm. ipar., 1963, 17, 339.
44. Roberts E. et al. Penicillin B, an antibacterial substance from *Penicillium notatum.*— J. Biol. Chem., 1943, 47.

ДРУГИЕ ФЕРМЕНТЫ

Рутиназа и **кверцитриназа** расщепляют гликозиды рутин и кверцитрин. Эти вещества относятся к флавоновым гликозидам, характеризующимся тем, что в их молекуле флавон (и флавонол) соединены гликозидной связью с остатком молекулы соответствующего сахара. В случае рутина — это дисахарид рутиноза, состоящий из остатков глюкозы и рамнозы, в случае кверцитрина — это рамноза. Оба гликозида содержатся во многих растениях — кожуре плодов яблок, листьях чая, табака и других, обычно обусловливая их желто-оранжевую окраску. Рутин, так же как и кверцитрин, обладает Р-витаминозными свойствами, проявляющимися в укрепляющем действии на стенки капиллярных сосудов.

В связи с этим изучение метаболизма данных гликозидов в организме и ферментов, производящих их расщепление, представляет значительный интерес. Однако работы, посвященные их расщеплению микроскопическими грибами, очень немногочисленны.

Гаттори и Ногуши [36] показали, что рутин расщепляется дрожжеподобным грибом *Pullularia fermentans* v. *candida,* с образованием флороглюцинола, протокатехиновой кислоты и 2-протокатехоил — флороглюцинолкарбоновой кислоты.

Фермент из мицелия гриба расщепляет рутин также с образованием этих веществ. Изучен комплекс ферментов, принимающих участие в разложении рутина (оксидаза), протокатехофлороглюцинкарбоновой (депсидаза), флороглюцинкарбоновой (декарбоксилаза) кислот. Фермент гриба гидролизует камфенол, мирицетин, кверцетин.

Уэстлэйк, Тэлбот, Блэклей, Симпсон [71] на основании изучения способности 280 культур бактерий и грибов разлагать рутин установили, что грибы более активно разрушали рутин и кверцетин, чем бактерии, дрожжи и актиномицеты. Использовали рутин штаммы *Alternaria, Botrytis, Fusarium, Cephalosporium, Dicoccum, Penicillium, Stemphylium, Pulvularia.* Неактивными оказались *Absidia, Armillaria, Ascochyta, Botryotrichum, Chaethomium, Coccospora, Mucor, Phycomyces, Rhizoctonia, Rhizopus, Stachybotrys, Trichoderma, Trichothecium, Verticillium.* Наиболее активно использовали рутин штаммы *Asp. flavus,* которые были изучены подробно. Фильтраты гриба

на средах с рутином или кверцетином разрушали оба эти субстрата, но не разрушали кверцитрина. Более активно разложение рутина проходило в аэробных условиях.

Рутин, кверцитрин и кверцетин могут использоваться штаммами *Asp. flavus* при росте в минеральной среде с образованием рутинозы, протокатехиновой кислоты, флороглюциноликарбоновой кислоты и окиси углерода.

Как установили авторы, образование моноокиси углерода является характерной реакцией в расщеплении флавонов грибами, но она отсутствует при расщеплении их бактериями. По их мнению, флавоновые соединения при использовании их грибами являются потенциальными источниками получения окиси углерода.

Уэстлэйк и Симпсон [72, 73] определили условия культивирования *Asp. flavus,* способствующие накоплению в культуральной жидкости ферментов, разрушающих рутин, и установили их свойства.

Asp. flavus выращивали на среде с 0,4% рутина, 0,3% $(NH_4)_2HPO_4$, 0,1% KH_2PO_4, 0,1% $MgCl_26H_2O$ и 0,8% $(NH_4)_2SO_4$.

Единицей активности рутиназы авторы считали количество фермента, необходимое для разложения 1 *мг* рутина за 3 *час* при 30° С. Реакционная смесь состояла из 2 *мл* культуральной жидкости или экстракта мицелия, 2 *мл* 0,1 М лимонной кислоты на 0,2 М Na_2HPO_4 буферном растворе (pH 6,5) и 40 *мг* рутина. Продолжительность реакции при встряхивании—3 *час.* Оптимальное pH 5,5—6,5.

Характерные процессы, связанные с метаболизмом рутина *Asp. flavus* при глубинном культивировании, приведены на рис. 33.

Для биосинтеза рутиназы и ее накопления в культуральной жидкости большое значение имеет степень аэрации. При выращивании гриба в колбах Эрленмейера емкостью в 250 *мл* в 25, 50 *мл* среды активность фермента выше, чем при выращивании в 100 *мл.* Необходимо наличие магния и сульфата. Углекислый кальций угнетает рост гриба и биосинтез фермента. При глубинном культивировании в ферментерах с 18 *л* культуральной жидкости изучена динамика накопления в ней двух основных компонентов ферментных систем, участвующих в расщеплении рутина: гликозидазы, гидролизующей кверцетинрутинозную связь и кверцетиназы, которая расщепляет гетероциклическое кольцо кверцетина.

Максимальное образование кверцетиназы и гликозидазы (единица — количество фермента, необходимое для освобождения 1 *мкмоля* рутинозы за 1 *час*) в среде отмечается после почти полного использования рутина (см. рис. 33). Рутиназа образуется при росте гриба на среде с рутином, геперозидом, нарингином или на агликонах кверцетина, кампферолe, рамне-

тине, 2,4-дигидроксибензойной кислоте, 3,4-дигидрооксифенилуксусной кислоте, но не на средах с глюкозой, галактозой, рамнозой или рутинозой и некоторых других гликозидах.

Очищенные препараты рутиназы получены путем последовательного фракционированного осаждения сульфатом аммо-

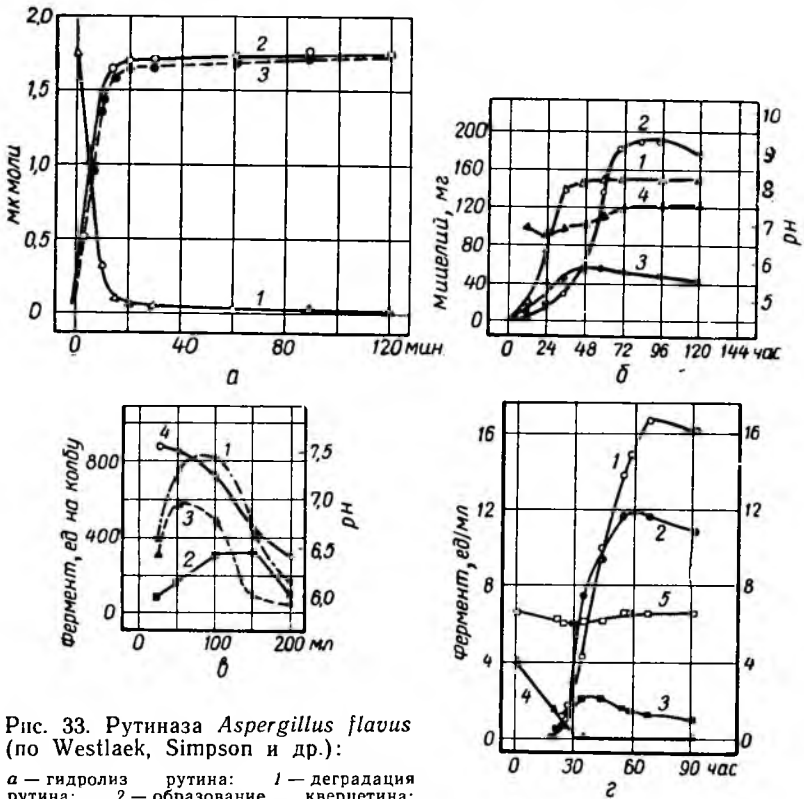


Рис. 33. Рутиназа *Aspergillus flavus* (по Westlaek, Simpson и др.):

а — гидролиз рутина: *1* — деградация рутина; *2* — образование кверцетина; *3* — образование рутиназы; *б* — рост *Asp. flavus* и образование рутиназы при глубинном культивировании в колбах на качалке (25 *мл* среды в 250 *мл* колбах): *1* — деградация рутина (*мг*), *2* — образование рутиназы (*ед/25 мл*), *3* — рост мицелия, *4* — изменение pH среды; *в* — влияние объема среды в 250 *мл* колбах на активность и распределение рутиназы: *1* — общая активность фермента, *2* — рутиназа мицелия, *3* — рутиназа в культуральной жидкости; *4* — изменение pH; *г* — образование двух компонентов ферментных систем — гликозидазы и кверцетиназы в ферментерах: *1* — кверцетиназа; *2* — гликозидаза; *3* — рост мицелия; *4* — деградация рутина; *5* — pH.

ния, этанолом, диамидом, адсорбцией на ДЕАЕ-целлюлозе, фракционированной элюцией NaCl и сульфатом аммония.

Рутиназа стабильна при низкой температуре как в растворах, так и очищенных препаратах: хранение при 0—20° С в течение трех недель сопровождается, соответственно, потерей активности на 15—30%. При pH 5,6 фермент стабилен при

50° С около 20 *мин.* Быстро инактивируется при pH 4,0 и pH 6,5.

Наиболее сильными ингибиторами рутиназы являются пиридин, диметиламин, хлористый алюминий и хлористая ртуть. Фермент специфичен. При гидролизе рутина рутиназой в среде накапливается рутиноза и кверцетин.

Дальнейший этап ферментативного гидролиза рутина *Asp. flavus*, связанный с расщеплением гетероциклического кольца кверцетина, вызываемым кверцетиназой, описан в работе Симпсона и др. [67]. Для образования кверцетиназы авторы использовали минеральную среду с хлористой медью, наличие которой стимулировало активность биосинтеза фермента у *Asp. flavus,* следующего состава: 0,4% рутина, 0,3% $(NH_4)_2HPO_4$, 0,1% KH_2PO_4, 0,1% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,8% $(NH_4)_2SO_4$, 0,002% $CuCl_2 \cdot 5H_2O$ и по 0,0001% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $FESO_4 \cdot 7H_2O$, $MNSO_4 \cdot H_2O$.

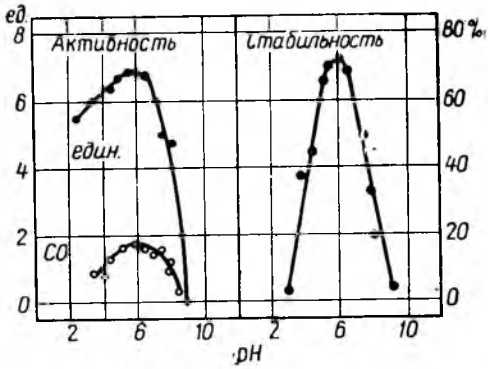


Рис. 34. Влияние pH на активность и стабильность кверцетиназы *Asp. flavus* (по Simpson и др.).

При росте на этой среде выход фермента составлял 30—40 *ед/мл,* через 72 *час* ферментации.

Установлено, что образование фермента происходит также при росте на среде с рутином, кэмпферолом, гиперозидом, но значительно слабее, чем на среде с кверцетином.

Полученный очищенный препарат кверцетиназы, свободный от рутиназы и эстеразы, обладал высокой специфической активностью (6600 *ед/мг* белка по сравнению с 166 *ед/мг* белка исходной культуральной жидкости). Подогревание до 70° в водяной бане в течение 20 *мин* и последующее быстрое охлаждение при 0° С не инактивировало кверцетиназы. Оптимум pH 6,0 (рис. 34). Реакция расщепления гетероциклического кольца молекулы кверцетина ферментом сопровождалась поглощением молекулы кислорода и образованием молекулы окиси углерода и молекулы депсида [2′—(3′,4′-дигидроксибензойлокси)-4,6-дигидроксибензойной кислоты].

Гайлд, Симпсон и Уэстлэйк [20] из этого же штамма *Asp. flavus* получили фермент рутинэстеразу, который гидролизует этот депсид. Гриб выращивали на среде с 0,4% рутина. Активность рутинэстеразы определяли количеством протокатехиновой кислоты, образуемой в среде при гидролизе депсида (рис. 35).

Очищенный фермент эстеразы проявлял узкую субстратную специфичность; оптимум pH 4,5. Он относительно термостабилен — подогревание при pH 4,5 до 55° С на протяжении 10 *мин* сопровождается потерей 15% исходной активности, при 60° С — 20% и при 70° С — 80%. В связи с этим препараты эстеразы нагреванием до 60° С в течение 10 *мин* могли быть освобождены от рутиназы, более термолабильной. Сохранение активности эстеразы при подогревании до 60° С наблюдается также в до-

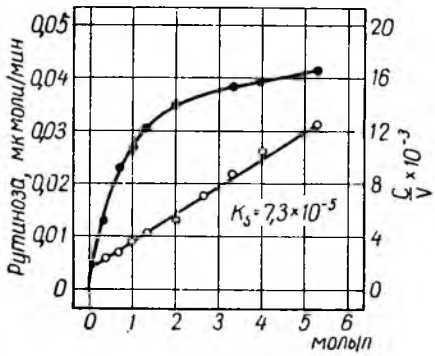


Рис. 35. Влияние концентрации рутина на скорость его гидролиза (по Hay, Westlake).

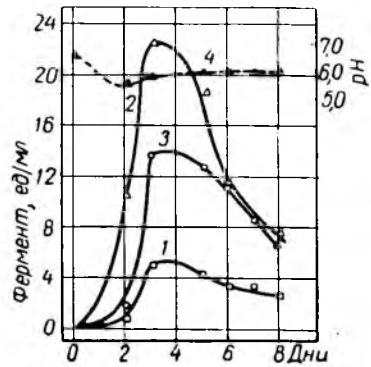


Рис. 36. Образование комплекса рутинразрушающих ферментов *Asp. flavus* (по Child, Simpson, Westlake): *1* — рутиназа; *2* — кверцетиназа; *3* — эстераза; *4* — pH.

вольно широком диапазоне pH. Так, при pH 6,0 и этой температуре в течение 10 *мин* активность сохраняется на 57%, при pH 3,0 — на 60%. Фермент относительно устойчив к хранению на холоду. Активность его полностью ингибируется натрий флюоридом, натрий арсенатом, три-(гидроксиметил) аминометаном, а также хлористым кальцием и альбумином.

Таким образом, гидролиз сложного соединения рутина до образования водорастворимых соединений и окиси углерода осуществляется комплексом ферментов, образуемых *Asp. flavus*: рутиназы, осуществляющей гидролиз рутина до образования агликона кверцетина и рутинозы, кверцетиназы — гидролизующей агликон кверцетин до образования окиси углерода и депсида [2′—(3′, 4′—дигидроксибензойлокси)—4, 6-дигидроксибензойной кислоты], и специфической эстеразы, осуществляющей гидролиз последней с образованием флавоглюцинолкарбоновой и протокатехиновой кислот (рис. 36).

Близкий по химическому строению флавоновый гликозид кверцитрин, имеющий также аглюкон кверцетин, но соединенный гликозидной связью с остатком рамнозы, не гидролизует-

ся перечисленными выше ферментами, разрушающими рутин. Уэстлэйк показал, что различные виды грибов способны усваивать этот гликозид и накапливать в культуральной жидкости кверцитриназу — фермент, гидролизующий его. Автором были изучены *Alternaria* sp., *Asp. niger, Cephalosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Pullularia* sp. и 17 штаммов *Asp. flavus*. Из последних культур отобрано два штамма, которые при росте на среде с 0,2% кверцитрина образовывали в культуральной жидкости значительные количества кверцитриназы (табл. 32).

Таблица 32

Использование кверцитрина разными штаммами *Aspergillus flavus*

№ штамма	Использование кверцитрина в %	Наличие кверцитриназы в культуральной жидкости	№ штамма	Использование кверцитрина в %	Наличие кверцитриназы в культуральной жидкости
185	28.9	0	893	89,2	±
187	86,0	+	895	81,0	+
864	17,3	0	897	25,4	0
867	21,7	0	899	18,4	0
870	34,3	0	50	89,2	±
892	87,3	±	99	85.3	—

Первоначальными продуктами гидролиза являются кверцетин и рамноза. Изучено влияние различных гликозидов, источников азота на биосинтез грибом кверцитриназы. Установлено, что рутиназа и кверцитриназа при упомянутых условиях культивирования *Asp. flavus* в более значительном количестве накапливаются в культуральной жидкости гриба и в меньшем — в мицелии (табл. 33).

Таблица 33

Распределение кверцитриназы и рутиназы между мицелием и культуральной жидкостью *Asp. flavus*

Фермент	Фильтрат	Мицелий	Итого	% выделения
Кверцитриназа	64,6	17,7	82.3	78,8
Рутиназа	219	16,2	235,2	93,1

Гиппуриказа — фермент, расщепляющий гиппуровую кислоту на бензойную и глицин, отмечена у пенициллов и некоторых других грибов.

Способность некоторых видов патогенных грибов *Fus. sporotrichiella, Asp. niger, Trichoderma lignorum* использовать

гиппуровую кислоту как источник азота исследована Сухенко [9].

В опытах автора грибы культивировались на минеральной среде с 3% глюкозы и 0,4% гиппуровой кислоты. Определение глицина (гликокола), гиппуровой и бензойной кислот в культуральной жидкости проводилось хроматографическим методом в системе растворителей *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 1) или *n*-бутанол : этанол : 1,5-н. углекислый аммоний (2 : 1 : 1) с прибавлением аммиака.

Было установлено, что *Trichoderma* и патогенные грибы плохо растут на среде с гиппуровой кислотой, а *Fus. sporotrichiella, Asp. niger* — хорошо. Ацетоновый экстракт из мицелия или гомогенизированная его масса в 1/15 М фосфатном буфере pH 6,3—7,0 также расщепляли гиппуровую кислоту с образованием гликокола и бензойной кислоты через 20—24 *час* инкубации. При этом активная гиппуриказа, экстрагируемая 1/15 М фосфатным буфером, обнаружена в мицелии грибов как хорошо, так и плохо растущих на среде с гиппуровой кислотой. В культуральной жидкости грибов хорошо растущих на среде с гиппуровой кислотой, с возрастом культуры уменьшилось не только содержание гликокола, глюкозы, но также и бензойной кислоты. Последняя к 51-дневному возрасту культуры полностью метаболизировалась *Fus. sporotrichiella* при поверхностном его культивировании на среде с 1%-ным бензойнокислым натром.

Содержание бензойной кислоты в культуральной жидкости грибов, плохо растущих на среде с гиппуровой кислотой, не изменялось, а бензойная кислота не усваивалась *Trichoderma lignorum* и видами патогенных грибов и при росте их на среде с 1%-ным бензойнокислым натром.

Танназы *Asp. niger* исследованы Липпич [52]. В опытах автора фермент получался из мицелия гриба после предварительного культивирования на среде с глюкозой и среде с таннином путем экстракции смесью ацетона и эфира. Ферментативная активность определялась по образованию галловой кислоты и манометрически в аппарате Варбурга. Активность танназы мицелия *Asp. niger* при росте на среде с 2% таннина зависела также от источника азота. По данным опытов автора наиболее благоприятным из числа испытанных был гидролизат казеина (см. рис. 56, *г*). Стимулирующее влияние на активность танназы оказывало наличие в среде микроэлементов. Адаптация мицелия к росту на среде с таннином в присутствии различных аминокислот оказывает влияние на биосинтез свободных и связанных аминокислот в мицелии гриба. Специфическими субстратами для биосинтеза танназы в мицелии *Asp. niger,* кроме таннина, могут быть галловая и хебулиновая кислоты.

Леви и Томпсон [51 а] изучили условия образования хлорогениказы у разных микроорганизмов и выделили активные штаммы дрожжеподобного гриба *Pullularia pullulans*, а также видов *Asp. oryzae, Asp. fumigatus, Asp. tamarii.*

Хлорогеновая кислота играет важную роль в ферментативных окислительно-восстановительных процессах в высших растениях и их устойчивости к различным заболеваниям (Кретович, 1964). С другой стороны, ферментативное окисление хлорогеновой кислоты и других фенолов в плодах и фруктах имеет значение в технологии консервной промышленности.

В опытах авторов первичный отбор микроорганизмов, образующих хлорогениказу, проведен путем посева различных микроорганизмов — бактерий, грибов на среду, содержащую 1 *г* хлорогеновой кислоты, 3 *г* K_2HPO_4, 1 *г* NH_4Cl, 0,52 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ в 1 *л* и имеющую pH 7,0, а также на некоторых других средах.

Авторы отмечают, что только немногие из испытанных ими микроорганизмов обладали способностью образовывать этот фермент при росте на среде без хлорогеновой кислоты, в то время как на среде в последней наблюдался обильный рост отдельных видов грибов.

Культивирование проводилось в колбах на качалке и в ферментерах с 10 *л* среды. Наличие хлорогениказы в культуральной жидкости определялось по образованию кофейной кислоты. Реакционная смесь состояла из 1 *мл* 1%-ной хлорогеновой кислоты в калий-фосфатном буфере pH 6,0 и 0,5 *мл* фильтрата, добавлялось несколько кристаллов тимола. Инкубация при 35° С. В определенные промежутки времени инкубационная смесь хроматографировалась на бумаге и разгонялась в н-бутиловом спирте : уксусной кислоте : воде (4 : 1 : 1). Пятно кофейной кислоты в этих условиях имело *Rf* 0,85, хлорогеновой — 0,65, обнаруживаемые в УФ.

Фермент содержится главным образом в мицелии гриба, и активность биосинтеза его увеличивается с возрастом культуры.

Значительное число исследований посвящено выделению и изучению ферментов, осуществляющих отдельные звенья метаболизма углеводов, фосфора, серы и другие процессы. Приводим некоторые из них.

Комплекс окислительных ферментов *Fusarium lini* (=*Fusarium oxysporum* f. *lini*) в различных условиях культивирования изучался рядом авторов. Хис и др. [38] в опытах с радиоактивной глюкозой установили способность гриба к аэробному и анаэробному ее окислению. Кохрэйн [22] показал, что покоящиеся клетки гриба в анаэробных условиях разлагают глюкозу до углекислоты и воды; в экстрактах было установлено наличие альдолазы, карбогидразы, этилдегидразы.

Окислительно-восстановительные ферменты в клетках *Fus. oxysporum f. lini* и фракции митохондрий и микросом являлись предметом исследования Кукухи и др. [49]. Спектрографическим анализом в обеих фракциях установлено наличие цитохромов *a*, *b*, *c*, цитохромоксидазы ДПН и ТПН.

Специфические ТПН-дегидразы глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата выделены из мицелия *Asp. niger* при выращивании на среде с мелассой или с дрожжевым экстрактом.

Дегидраза глюкозо-6-фосфата значительно быстрее восстанавливает пиридиннуклеотид, чем дегидраза 6-фосфоглюконата. Активность ферментов, выделенных из мицелия гриба, зависит от условий культивирования. В опытах авторов наибольшая активность их отмечалась в мицелии, выращенном на среде с мелассой. Специфическая дипиридиннуклеотиддегидраза в мицелии выявлена только на этой среде [27].

Глицериндегидрогеназа *Asp. niger* является узко специфическим ферментом — ее активность при использовании в качестве субстрата эритрита равна 30%-ной активности глицерина как субстрата и 10%-ной DL-глицеральдегида. Сорбит, маннит, этанол, этилен-гликоль, 2,3-бутилен-гликоль, 1,3-пропанедиол, галактуроновая, глюконовая и α-кетоглюконовая кислоты не восстанавливаются ферментом. Считают, что фермент глицерин-дегидрогеназа из *Asp. niger* может играть роль в биосинтезе глицерина или глицер-альдегида.

Для получения фермента гриб выращивался в течение четырех дней на среде с глюкозой. Фермент экстрагирован из мицелия (буфером pH 7,6) и осажден сульфатом аммония. Фракция между 68—80% насыщения была диализована против 0,02 М ацетатного буфера (pH 6,5) и хроматографирована на гельцеллюлозной колонке. Глицерин-дегидрогеназа элюировалась буфером, содержащим 2% сульфата аммония. Полученный препарат был концентрирован в 250 раз по сравнению с исходным и обладал специфической активностью в 25 *ед/мг* белка.

Баринова [1] установила наличие сукциндегидразы в экстрактах мицелия *Rhizopus nigricans, Asp. niger* при глубинном методе культивирования на минерально-глюкозной среде. Фермент ингибируется 0,02 М малоновой кислотой, но последняя в концентрации 0,02—0,06 М не угнетает роста грибов. Автор считает, что цикл трикарбоновых кислот не играет роли в дыхании и обмене веществ этих грибов.

Чайэнг и др. [18, 19] изучили метаболизм d-ксилозы, L-арабинозы экстрактами из клеток *Pen. chrysogenum*. Авторы установили, что исходным этапом в метаболизме ксилозы грибом является восстановление ксилозы до ксилита. Эта реакция осуществляется ферментом d-ксилоредуктазой, проявляющим действие в присутствии восстановленного трифосфонуклеотида как

кофермента. Авторами получен очищенный препарат фермента, изучены некоторые его свойства (к объяснению механизма действия). Образованный d-ксилозоредуктазой ксилит являлся промежуточным продуктом и окислялся затем ферментом, нуждающимся в присутствии дифосфонуклеотида в качестве акцептора водорода для окисления D-ксилита в D-ксилюлозу (кетопентоза). Начальным этапом метаболизма арабинозы также является образование L-арабита, вызываемое ферментом L-арабинозоредуктазой с последующим окислением его до L-ксилозы и L-рибулозы; L-ксилоза может быть восстановлена в D-ксилит и затем окислена до D-ксилозы. Результаты исследований имеют значение для познания путей обмена пентоз.

Инвертаза, трансфруктозидаза изучались у отдельных видов грибов. Билинг, Бэкон [15] установили, что при гидролизе сахарозы экстрактами из мицелия *Asp. niger, Asp. oryzae, Pen. spinulosum, Pen. chrysogenum, Asp. flavus, Eremascus fertilis, E. albus* образуются не только глюкоза и фруктоза, но также фруктозосодержащие олигосахариды.

Отмечено влияние микроэлементов и их различных комбинаций на рост мицелия и активность биосинтеза инвертазы *Asp. niger.* Цинк благоприятно влияет на рост биомассы гриба. При наличии в среде марганца, железа, меди добавление цинка повышает активность образования инвертазы в мицелии, а при наличии в среде цинка, марганца и меди добавление железа также повышает образование инвертазы в мицелии, но снижает его в культуральной жидкости. Добавление меди к среде, содержащей железо, марганец и цинк, стимулирует рост мицелия и биосинтез каталазы. Наиболее высокая активность инвертазы в мицелии *Asp. niger* была при наличи в среде меди, железа и цинка [40].

Биосинтез и некоторые свойства ивертазы у ряда грибов *Pen. brefeldianum, Pen. parvum, Pen. quadrilineatum, Pen. melinii, Pen. funiculosum, Fus. moliniforme* изучались Риис с сотрудниками [61]. Показано, что инвертаза разных видов грибов содержит от одного до трех активных компонентов.

Гексокиназа из *Asp. parasiticus* исследовалась Дэвидсон [25а]. Установлено, что этот гриб образует полисахарид, состоящий из галактозамина. Исследования автора проведены с целью изучения механизма ферментативного расщепления данного сахара. Концентрированный фермент из экстракта мицелия фосфорилировал d-галактозу и d-галактозамин с образованием соответствующих 6-фосфатов.

Влияние микроэлементов на активность гексокиназы из мицелия *Asp. niger* изучали Кумар, Кришнан [51]. Стимуляция общей и специфической активности гексокиназы отмечена при прибавлении к свободной от микроэлементов питательной среде цинка, марганца.

Коллинс, Корнберг [21] изучали ферменты, осуществляющие метаболизм ацетата у *Asp. niger*. При использовании радиоактивного по углероду ацетата (2—C^{14}) авторы установили, что изотоп ацетата одновременно включается в соединения циклов трикарбоновых кислот и глиоксалатного. Среди продуктов реакции в первые 50—300 *сек* обнаружены лимонная и яблочная кислоты.

При выращивании *Asp. niger* на среде с ацетатом из мицелия были выделены ферменты изоцитратаза и малатсинтеаза, катализирующие при добавлении коферментов образование яблочной и янтарной кислот из уксусной и изолимонной. При выращивании на среде с глюкозой или сукцинатом в мицелии преобладает малатсинтеаза.

Франк и др. [29] изучили ферменты, осуществляющие превращение C_2-кислот *Asp. niger*, они выделили глиоксалат трансаминазу, глиоксалатредуктазу, фермент, осуществляющий конденсацию глиоксиловой и α-кетоглютаровой кислот.

Капроновая кислота является одним из промежуточных соединений при ферментативном биосинтезе жирных кислот из уксусной кислоты. Окисление капроновой кислоты при использовании ее в качестве источника углерода в минеральной среде способны осуществлять *Asp. tamarii, Asp. niger* [46]. Первый вид может превращать капроновую кислоту в метилпропилкетон (на 60—70%) и метиламинкетон; гептиловую — в метилбутилкетон и образовывать соответствующие кетоны из лауриновой, пальмитиновой и других кислот. Способностью образовывать кетоны из каприловой кислоты обладают конидии многих других видов микромицетов. Так, по данным Гериг и Найт [30], конидии девяти из 11 испытанных аспергиллов, девяти из 12 пенициллов образуют 2-гептанон из каприловой кислоты; мукоровые грибы не активны в этом отношении.

Изучая фосфатазную активность у разных видов *Aspergillus*, обычных почвенных грибов, Касида установил, что мицелий и экстракты из него у изучаемых грибов разлагают органические и неорганические соединения фосфора в почве. «Кислая» фитаза *Aspergillus* частично дефосфорилировала фитат железа — соединение, трудно поддающееся разложению. Наибольшая активность фосфатаз проявлялась при кислом pH, хотя не прекращалась при реакции, близкой к нейтральной [17].

Жакке и др. [44] показали, что в фильтратах различных видов плесневых грибов содержится два типа фосфатаз: активных при кислом pH (4,0—4,5) и активных при щелочном pH (8,0—8,5). Авторы определяли влияние возраста культуры, состава среды, ее pH на активность фосфатаз разных видов грибов. Активность «кислой» фосфатазы повышалась при добавлении магния, угнеталась цианидами; активность «щелочной» фосфатазы угнеталась молибденом, слабо — цианидами.

В опытах Патти и др. [57] установлено влияние магния и бария на активность «щелочной» фосфатазы у *Pen. lilacinum, Asp. niger, Asp. oryzae, Rhizoctonia violacea.*

Кунинака и соавторы [50] установили, что при действии на нуклеотиды ферментного препарата из *Asp. oryzae* в качестве продуктов реакции образуются аденин, гуанозин, цитидин, уридин, неорганический фосфат. Авторы считают, что гриб содержит мононуклеотидазу, дезаминазу адениловой кислоты, пуриннуклеозидгидролазу, рибонуклеодеполимеразу.

Куртис и Томас [24] изучили метаболизм 4-аминопиразоло-3,4-пиримидина (аналога пурина) и аденина грибами *Cordyceps militaris, Asp. caespitisus, Gibberrela fujikuroi, Mucor racemosus, M. ramannianus, Penicillium griseofulvum, Scopulariopsis brevicaule, Trichoderma viride.*

Грибы культивировались на пептонно-глюкозной среде с добавлением аденина или производного пурина. При поверхностном культивировании с меченым солянокислым или сернокислым аденином (100—500 *мг/л*) через 28 дней у *Cordyceps militaris* наблюдалось образование кордицепина. При росте на такой же среде с добавлением 100 *мг/л* 4-аминопиразоло-3,4α-пиридина изучаемые грибы превращали последний в рибозид, а *S. brevicaule* — в 4-гидроксипиразоло 3,4-α-пиридин рибозид. Рост *C. militaris* на среде с добавлением ароматических аминов (2,6-диаминобензотиазола, 5-амино-1,2-диметилбензимидазола, 5-амино-2-оксибензимидазолина) сопровождался превращением этих соединений в соответствующие моноацетильные производные. Определение продуктов превращения поризводилось методом хроматографии с последующей их изоляцией.

Полученные данные представляют определенный интерес для моделированного изучения на грибах возможных превращений аденина и пуринов в процессах обмена веществ.

Михайловская [8] выделила из растворимых в трихлоруксусной кислоте соединений мицелия *Asp. niger* аденозинтрифосфатазу, а также аденозинтрифосфазную кислоту и промежуточные продукты углеводного обмена — гексозомонофосфат и пировиноградную кислоту.

Хигуши [10] изучал условия биосинтеза и распада флавинмононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД) и ферментные системы, осуществляющие эти процессы у различных штаммов *Asp. niger.* Автор отмечает, что синтез рибофлавинсодержащих соединений наиболее интенсивно происходит у медленно растущих штаммов, характеризующихся определенными морфологическими признаками — задержанным спороношением, укороченными конидиеносцами. Отобран для дальнейшего изучения штамм *Asp. oryzae*, обладающий высокой активностью биосинтеза флавинадениндинуклеотида

(49 *мкг/г* сухого мицелия) и изучены условия, влияющие на биосинтез ФМН, ФАД.

Фосфатазы гриба, осуществляющие гидролиз ФДН до ФМН угнетаются Fe, Ag, Mo имеют довольно узкий предел активности pH (при pH 3,2 или pH 6,4 активность фермента снижается). Лучшим источником азота в минеральной среде является нитрат, ионы железа в среде снижают биосинтез флавиннуклеотидов, рибофлавин не оказывает заметного влияния. Наибольшее количество флавиннуклеотидов содержится в мицелии молодой культуры; с возрастом в мицелии *Asp. oryzae* резко падает содержание ФАД и более постепенно — содержание ФМН.

При изучении метаболизма никотиновой кислоты растущими и покоящимися клетками *Asp. niger* установлено, что гриб обладает активной деамидазой и деамидирование никотиновой кислоты является одним из характерных и основных путей ее метаболизма грибом.

Гриб выращивался на среде, содержащей 2—20 *мкмолей* никотиновой кислоты, в течение четырех дней. После отделения от культуральной жидкости мицелий промывали холодным раствором 0,9%-ной соли, отжимали от влаги и замораживали в течение 1 *час* при —5° С; затем пленку растирали с равным количеством алюминия и 10%-ный гомогенат в 0,1М фосфатном буфере при pH 7,2 использовался для исследований. Определялись реакции амидирования, метилирования, связывания глицина, деамидирования никотиновой кислоты. Продукты метаболизма реакционной смеси и экстракта из мицелия определялись различными хроматографическими методами.

Никотинамид в дозах от 500 *мкг/мл* и выше задерживает рост мицелия гриба и вызывает образование желтого флюоресцирующего пигмента в культуральной жидкости. Никотиновая кислота, глютамин, аспарагин, мочевина и др. такого действия не оказывают. По мнению авторов, образование упомянутого пигмента под влиянием повышенных доз никотинамида в среде является одним из характерных свойств его воздействия на *Asp. niger* [63].

Гайне и Линскенс [39] изучили фермент кутиназу у видов *Penicillium* sp., *Fusarium moniliforme, Rhodoforula glutinosus* при их росте на среде с кутином из листьев *Gasteria verrucola.*

Кутин — воскоподобный налет на плодах, листьях, стеблях различных растений, состоит из различных высокомолекулярных спиртов, углеводородов парафинового ряда, некоторого количества свободных жирных кислот.

Кутиназа фитопатогенных видов грибов (*Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea, Cladosporium cucumerinum, Pyrenophora graminea* (syn. *Helminthosporium graminearum), Penicillium spinulosum*) исследовалась Линскенсом и Гааджем [51б]. Ак-

тивность фермента определялась по способности разлагать кутин растений-хозяев и стандартного препарата из *Gasteria verrucola*. Установлено, что кутиназная активность изучавшихся видов различна и зависит от происхождения кутина. Авторы считают, что активность кутиназы у фитопатогенных грибов может иметь значение в их проникновении через неповрежденные оболочки клеток растения-хозяина.

Большую роль в обмене веществ играют холестерин, содержащийся в животных клетках, особенно клетках нервной ткани (организм человека содержит около 140 *г* холестерина) и эргостерин, содержащийся в дрожжах и некоторых видах грибов. Роль отдельных ферментов в метаболизме холина, холестерина, органических и неорганических источников серы у микроскопических грибов изучена мало. Отмечено, что хилинсульфат широко распространен у высших грибов, а также у отдельных видов пенициллов, аспергиллюс [42]. Холестерин стимулирует рост мицелия, увеличивает окислительно-восстановительный потенциал среды, ее поверхностное натяжение [53].

Гарад и Спенсер [32, 33] изучали метаболизм холинсульфата у 32 штаммов разных видов грибов. Установлено его наличие у многих видов несовершенных грибов; отсутствует у мукоровых — *Rhiz. stoloniferum, Mucor hiemalis, Phycomyces blackesleeanus, Cunninghamella echinulata,* видов дрожжей и бактерий. Синтез холинсульфата у *Asp. oryzae* происходит при росте на среде с минимальным содержанием неорганической серы, цистеина или цистеиновой кислоты. Более детально авторы исследовали ферменты холинсульфокиназу и арилсульфатазу.

Грибы выращивали на трех средах: Чапека—Докса с неорганической серой (+100 *мкг* $Na_2{}^{35}SO_4$), глюкозопектонной среде с дрожжевым экстрактом 0,6 *г* Na_2SO_4 (+100 *мкг* $Na_2{}^{35}SO_4$) и среде с холином (1,2 *г/л*). Наличие сульфатов в мицелии и культуральной жидкости определялось хроматографическим и радиоавтографическим методами в трех системах растворителей — фенол : вода (80 : 20), ацетон : вода (9 : 1), бутанол : этанол : вода (4 : 1 : 5).

Петерсон, Мэнди и Фаг [58] считают, что холестерол, добавленный в питательную среду, может поглощаться клетками мицелия *Penicillium* sp. После роста грибов в погруженной культуре холестерол не экстрагировался хлороформом ни из культуральной жидкости, ни из мицелия гриба, но в то же время не были обнаружены и продукты его метаболизма. Изучаемые виды грибов не росли на среде с холестерином. При этом, как отмечают авторы, отложение стерола в клетках мицелия зависело от наличия источника энергии и уровня эндогенного дыхания.

По данным Робсона [60], соединения серы быстро метаболизируются растущим мицелием *Asp. niger, Pen. notatum* в ранних стадиях и выделяются в виде различных соединений в среду из клеток мицелия в более поздних стадиях роста. Показано, что соединения серы находятся в оболочке и цитоплазме. Накопление соединений серы в мицелии грибов не всегда происходит за счет содержащих SH-группу.

В период спорообразования в мицелии грибов содержится больше холинсульфата, чем в активно растущих культурах.

Бойттхер [16] изучил влияние некоторых видов грибов на разложение комплекса яичного желтка, богатого лецитином (фосфолипид, соединенный с азотистым основанием — холином).

Грибы *Rhiz. japonicum, Rh. arrhizus, Asp. flavus, Asp. niger, Pen. chrysogenum* культивировались на среде из смеси яичного желтка с NaCl. В процессе культивирования определялись реакция преципитации, образования холина, фосфорилхолина, кислоторастворимого фосфора, триметиламина. Через девять дней у всех культур обнаружены холин и кислоторастворимый фосфор, на 20-е сутки холин у отдельных видов не отмечался, а накопление кислоторастворимого фосфора увеличилось. Под влиянием большинства изученных грибов фосфор липидов переходит в кислоторастворимый.

Полигалактуроназа, α-амилаза, протеиназа, целлюлаза, липаза изучалась [26] у 27 видов *Aspergillus*, 14 видов и 15 неопределенных культур *Penicillium, Alternaria tenuis, Botrybis cinerea, Stachybotrys atra, Trichoderma viride, Trichothecium roseum* и некоторых других видов.

Даз-Гюпта и Верма [25] установили наличие различных ферментов в культуральной жидкости и мицелии трех видов *Alternaria — A. tennins, A. brassicola, A. raphani.*

Авторы показали, что экстракты из мицелия и культуральная жидкость шестидневного возраста культур этих видов грибов содержат амилазы, инвертазу, раффиназу, гемицеллюлазу, целлюлазу, мальтазу, фосфорилазу, протопектиназу, альдолазу, липазу, бутиразу, дегидрогеназы, протеиназы, эрепсиназы, ренназу, уреазу, амидазы и дезаминазы многих аминокислот, рибонуклеазу, нуклеодезаминазу, глицерофосфатазу, нуклеофосфатазу, оксидазы, каталазу. Отмечены отличия в наличии некоторых ферментов в мицелии и культуральной жидкости, но не между отдельными видами.

Обширный комплекс ферментов углеводного обмена установлен у различных видов аспергиллов [11, 12, 13].

У отдельных видов грибов изучены уреаза и цитраза [66], тиаминаза [41, 62], липаза [70а, 29а, 13а], хитиназа [59] и многие другие ферменты.

В заключение следует отметить, что число исследований, посвященных изучению различных ферментов у грибов, как и число видов их, все более возрастает и, несомненно, полное обобщение исследований по этому вопросу было бы весьма своевременным и полезным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баринова С. О цикле трикарбоновых кислот у плесневых грибов.— Микробиология, 1960, **29**, 21.

1а. Баринова С. Об образовании «активной» CO_2 в культурах *Aspergillus niger*.— Микробиология, 1964, **32**, 404.

2. Белл Д. Моно- и олигосахариды и кислотные производные моносахаридов.— В кн.: Биохим. методы анализа растений. Под ред. М. Запрометова. ИЛ, М., 1960.

3. Вартанян Б., Богданова И. Превращение таннина чайного растения под воздействием *Penicillium expansum*.— Микробиология, 1964, **32**, 767.

4. Звягильская Р., Котельникова А. Изучение окисления различных субстратов и сопряженного с ним фосфорилирования в субклеточных препаратах из дрожжей *Endomyces magnuzii*.— Биохимия, 1964, **29**, 65.

5. Китавин Г. Действие аммиака на каталазную активность дрожжей и *Aspergillus niger*.— ДАН СССР, 1957, **113**, 1363.

6. Котельникова А., Звягильская Р. АТФ-азная активность митохондрий из дрожжей.— Биохимия, 1964, **29**, 662.

7. Кулаев И. и др. Изучение механизма поглощения ортофосфата средой мицелием *Penicillium chrysogenum*.— Биохимия, 1964, 29, 759.

8. Михайловская Т. Данные по биохимии фосфорных соединений штаммов *Asp. niger* и *Actin. violaceus*, образующих антибиотики.— Укр. біохім. ж., 1956, **28**, 465.

9. Суханко Ф. Об использовании гиппуровой кислоты некоторыми грибами.— Биохимия, 1958, **29**, 493.

10. Хигуши. Биосинтез и разрушение флавинмононуклеотида и флавинадениндинуклеотида *Aspergillus oryzae* 2. Фосфатаза у *Asp. oryzae*. 3. Среда и биосинтез флавинадениндинуклеотида.— РБЖ, 1958, 1, 579 (Vitamins, 1956, **11**, 559).

11. Agnihorti Y. Studies in Aspergilli — X — utilization of polysaccharides.— Canad. J. Microbiol., 1961, **9**, 703.

12. Agnihorti Y. Studies in Aspergilli — carbon requirements of some ascosporic members of the *Aspergillus nidulans* group.— Acta biol. Hung., 1963, **14**, 45.

13. Agnihorti Y. Studies in Aspergilli. 8. Sulphur requirements of some ascosporic members of the *Aspergillus nidulans* group.— Pathol. et microbiol., 1963, **26**, 810.

13a. Alford I., Pierce D. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperature.— J. Food Sci., 1961, **26**, 518.

14. Ballio A. et al. Occurence of free nucleotides in *Penicillium chrysogenum*.— Biochem. biophys. acta, 1956, **20**, 414.

15. Bealing F., Bacon J. The action of enzymes on sucrose.— Biochem. J., 1953, **53**, 277.

16. Bötteher K. Die Wirkung einiger Pilze auf den Eigelb-Komplex.— Naturwissenschaften, 1960, 47, 256.

17. Casida L. Phosphatase activity of some common soil fungi.— Soil. Sci., 1959, 87, 305.

18. Chiang C., Knight S. The conversion of D-xylose to xylotol by *Penicillium chrysogenum*.— Biochem. biophys. acta, 1958, **29**, 664; **35**, 454.

19. Chiang C., Knight S. L-arabinose metabolism by cell-free extracts *Penicillium chrysogenum*.— Biochem. biophys. acta, 1961, **46**, 271.
20. Child J., Simpson F., Westlake D. Degradation of rutin by *Aspergillus flavus* — production, purification and characterization of an esterase.— Canad. J. Microbiol., 1963, **9**, 653.
21. Collins F., Kornberg H. The metabolism of C_2 compounds in microorganism. 4. Synthesis of cell materials from acetate by Aspergillus niger.— Biochem. J., 1960, **77**, 430.
22. Cochrane V. The anaerobic dissimilation of glucose by *Fusarium lini*.— Mycologia, 1956, **48**, 1.
23. Courtois J., Careére C., Pebec F. L'α-galactosidase de *Penicillium poxillus*.— Bull. Soc. chim. biol., 1959, **41**, 1251.
24. Curtis P., Thomas D. The metabolism of endogenous adenine and purine analagues by fungi.— Biochem. J., 1962, **82**, 381.
25. Das-Gupta S., Verma J. Studies in the enzyme make up Alternaria.— Current Sci., 1961, **2**, 450.
25a. Davidson E. Hexokinase from *Aspergillus parasiticus*.— J. Biol. Chem., 1960, 235, 23.
26. Dingle J., Solomons L. Enzymes from microorganisms.— J. Appl. Chem.. 1952, **2**, 395.
27. Donough M., Martin S. The hexosemonophosphate pathway in *Aspergillus niger*.— Canad. J. Microbiol., 1958, **4**, 329.
28. Evola Maitese C., Polettini C. Effetto del $BaCl_2$ sulla fosfatasi alkalina negli lumiceti in rapporto alla Mg-carenza. Rilievi quantitativi in *Penicillium lilacinum* Thom., *Aspergillus niger* (Tiegh) Ceppo, *Aspergillus orysae* Cohne *Rhizoctonia violacea* Tul.— Ann. fitopathol., 1961, **5**, 95.
29. Franke W. et al. Zum enzymatischen Umsatz von C_2-Säuren durch Mikroorganismen. I. Über Glyoxylat-transaminasen aus Schimmelpilzen, insbesondere *Aspergillum niger*. II. Über eine Glyoxylsäure mit a-Ketoglutazsäure kondensierendes Enzym aus *Aspergillus niger*. III. Über Glyoxylatreductase aus *Aspergillus niger*.— Arch. Microbiol., 1961, **39**, 58, 88, 95.
29a. France W., Platzeck A., Eichhorn G. Zur Kenntnis des Fettsäureabbaus durch schimmelpilze. III. Über eine Decarboxylase der mitteren β-ketonmonocarbonsäuren.— Arch. Microbiol., 1961, **40**, 73.
30. Gehring R., Knight S. Formation of 2-Heptanone from caprilic acid by spores of various filamentons fungi.— Nature, 1961, **192**, 4808, 1185.
31. Griffith J., Krewson C., Naghski I. Rutin and relatived flavonoids. Mark Publ. comp., Easton, 1955.
32. Harada H., Spencer B. Choline sulphate in fungi.— J. Gen. Microbiol., 1960, **22**, 520.
33. Harada T., Spencer B. The effect of sulphate assimilation on the induction of aryl-sulphatase synthesis in fungi.— Biochem. J., 1962, **82**, 148.
34. Harburne J., Sherratt H. The specificity of fungal anthocyanase.— Biochem. J. Proc., 1957, **65**, 24.
35. Hannan P. Location of an esterase in *Aspergillus niger*.— Appl. Microbiol., 1959, **7**, 115.
36. Hattori S., Nogushi I. Microbial degradation of rutin.— Nature, 1959, **184**, 1145.
37. Hay G., Westlake D., Simpson F. Degradation of rutin by *Aspergillus flavus*. Purfication and characterization of rutinase.— Canad. J. Microbiol., 1961, **7**, 921.
38. Heath E., Nasser D., Koffler H. Biochemistry of filamentous fungi. III. Alternative route for the breakdown of glucose by *Fusarium lini*.— Arch. Biochem. Biophys, 1956, **64**, 80.
39. Heinen W., Linskens H. Cutinabbau durch Pilzenzyme.— Naturwissenschaften, 1960, **47**, 18.
39a. Higgins E. Nitroaryl reductase of *Aspergillus niger*.— Enzymologia, 1961, **23**, 176.

40. Gorbach G. Terranova T., Terranova J.— Über den Einfluß von Spuren.— Arch. Microbiol., 1956, **26**, 1.

41. Ikehata H., Saji Y.— Изучение тиаминазы плесневых грибов — РБЖ, 1959, 19, 82, 871. (Vitamins, 1958, **16**, 1, 56).

42. Itahashi M. Сернокислый эфир холина как промежуточное вещество в метаболизме серы у грибов.— РБЖ, 1961, 22Б, 279. (Bot. Mag. Tokyo, 1960, 72, 275, 853).

43. Iwasa K., Imamoto F., Okunuki K. Adeposine triphosphatase of the intracellular particles of *Aspergillus orysae*.—J. Biochem., 1959, **46**, 2, 113.

44. Jasquet J., Villette O., Richou R. Les phosphotases des filtrats microbiens. 2. Meisissures.— Rev. immunol., 1958, **22**, 44.

45. Joshi A., Ramakrishnman C. Detection of oxalacetic carboxylase in citric producing strain of *Aspergillus niger*.— J. Sci. a. Ind. Res., 1958, Bc-17 9, C 156.

46. Karabinos J., Ferlin H. Microbiological oxydation of caproic acid to methyl propyl ketone.— Euclies, 1956, **16**, 184, 171.

47. Kato K. et al. Di-and triphosphopyridine nucleotide-linked glutamic dehydrogenases of *Periconia orysae* and their behavior in glutamate media.— Arch. Biochem. Biophys., 1962, **98**, 346.

48. Kieber R., Payne W., Apleton G. The sterol content fungi. 1. Methods for disrupting cells, extracting and determining sterols.— Appl. Microbiol., 1955, **3**, 347.

49. Kikuchi L., Barron E., Lurma N. Electron transport system in *Fusarium lini*.— Arch. Biochem. Biophys., 1959, **84**, 96.

50. Кунинака. Изучение разложения нуклеиновой кислоты микроорганизмами. 1. *Aspergillus orysae*.— РБЖ, 1957, 22, 93320. (Agric. Chem. Soc. Japan., 1955, **29**, 801: 1956, **30**, 583).

51. Kumar T., Krishnan P. Studies on hexokinase of the mycelium of *Aspergillus niger*.— Enzymologia, 1960, **22**, 93.

51a. Lewis J., Thompson P. Microbiological production of chlorogenicase.— Appl. Microbiol., 1961, **9**, 205.

51б. Linskens H., Haage P. Cutinase Nachweis in phytopathogenen Piezen.— Phytopathol. Zs., 1963, **48**, 306.

52. Lippitsch M. Untersuchungen über Tannase bei *Aspergillus niger*.— Arch. Microbiol., 1961, **39**, 209.

53. Matkovicz B., Pullay G. Die Wirkung von Cholesterin auf die Trochensubstanz von *Rhizopus orrhizus, Penicillium chrysogenum* Q 176, *Aspergillus niger, Mucor mucedo*-Kulturen.— Zbl. Bacteriol., 1958, Abt. 2, **3**, 440.

54. Noguchi I. The degradation of flavonols by *Pullularia fermentaus* v. *candida*.— Bot. Mag. Tokyo, 1963, **76**, 191.

55. Pal H., Krishnan P. The formation of cisaconitic decarboxylase in culture of *Aspergillus terreus*.— Arch. Microbiol., 1959, **34**, 158.

56. Pardon J. et al. Srecifity studies on an extracellular enzyme preparation obtained from quercetin grown cells of *Aspergillus*.— Biochem. Biophys. Res. Comm., 1960, **3**, 412.

57. Patti A., Polettini C. Rilievi quantitativi sulla fosfatasi alkalina negli — eumiceti. Influenze della Mg-carenza in *Penicillium lilacinum* Thom., *Aspergillus niger* Van Tiegh., *Rhizoctonia violacea* Tul.— Ann. fitopatol., 1961, **5**, 77.

58. Peterson G. Cholesterol deposition in *Penicillium* sp.— Canad. J. Microbiol., 1962, **8**, 193.

59. Pope S., Tomarelli R., Gyögy P. Isolation of ethyl-N-acetyl-β-d-glucosaminide from *Aspergillus niger* fermentation.— Arch. Biochem. Biophys., 1957, **68**, 362.

60. Robson J., Stockley H. Sulphhydryl metabolism of fungi grown in submerged culture.— J. Gen. Microbiol., 1962, **28**, 57.

61. Reese E., Bizzgalis R., Mandels M. Sucrases in fungi.— Canad. J. Biochem. a. Physiol., 1962, **40**, 273.

62. Sakakibara E., Katsumata M. Изучение тиаминазы. III. Очистка и свойства тиаминазы II.— РБЖ, 1959, 19, 82872. (Vitamins, 1958, 15, 570).
63. Sarma D., Rayalakshmi S., Sarma P. Metabolism of nicotin amide in *Aspergillus niger*.— Enzymologia, 1962, 24, 148.
64. Saruno R. Crystalization of ribonuclease from *Aspergillus orysae*.— Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 1956, 20, 57.
65. Segel K., Johnson M. Intermediates in inorganic sulphate utilization by Penicillium chrysogenum.— Arch. Biochem. Biophys., 1963, 103, 216.
66. Seneca H., Peer P., Nally R. Urease and citrase of pathogenic and saprophytic fungi.— Nature, 1963, 197, 4865, 359.
67. Simpson F., Narasimhachari N., Westlake D. Degradation of rutin by *Aspergillus flavus*. The carbon monoxide production system.— Canad. J. Microbiol., 1963, 9, 15.
68. Shimoto K. The metabolism of cholic acid by *Penicillium islandicum*.— Hiroshima J. Med. Sci., 1958, 7, 147.
69. Spencer B., Harada T. The role of choline sulphate in the sulphur metabolism of fungi.— Biochem. J., 1960, 77, 305.
70. Stadtman C., Cherkes A., Anfinsen C. Microbiological degradation of cholesterol.— J. Biol. Chem., 1954, 206, 511.
70a. Viswanathan C., Leley V., Norayana N. Studies in lipolysis by fungi.— J. Sci. a. Ind. Res., 1961, C20, 135.
71. Westlake D. et al. Microbial decomposition of rutin.— Canad. J. Microbiol., 1959, 5, 621.
72. Westlake D., Roxburgh I., Talbot G. Microbial production of carbon monoxide from flavonoides.— Nature, 1961, 189, 510.
73. Westlake D., Simpson F. Degradation of rutin by *Aspergillus flavus*. Factor affecting production of the enzyme system.— Canad. J. Microbiol., 1961, 7, 33.
74. Westlake D. Microbiological degradation of quercitrin.— Canad. J. Microbiol., 1963, 9, 211.

II. АМИНОКИСЛОТЫ

Различные белки отличаются составом аминокислот, образующихся при гидролизе белковой молекулы (табл. 34).

По функциональным химическим группам и биологической характеристике различают незаменимые аминокислоты, т. е. такие, которые не синтезируются в организме человека и животных, и заменимые, которые могут образовываться в процессе обмена веществ. К первым относят лизин, метионин, триптофан, треонин, лейцин, валин. Кроме перечисленных в табл. 35, в белках микроорганизмов, растений, животных в последнее время открыт ряд новых аминокислот или их аналогов. Например, D-пеницилламин из пенициллина, циклосерин из антибиотика *Streptomyces orchidatius,* азасерин из антибиотика *Streptomyces* sp., метиллантионин из антибиотика субтилина и др. (Кочетков и др., 1961).

Метионин — серосодержащая, присутствующая во всех природных белках аминокислота, незаменимая для организма человека и животных. Он принимает участие в метаболизме белков и жиров. Получается из природных субстратов и путем синтеза рацемической DL-формы. Благодаря наличию лабильной метильной группы в молекуле метионина D-аминокислота может служить трансметилирующим агентом при обмене. Является также липотрофическим фактором, обладает детоксирующими свойствами благодаря присутствию серы в его молекуле. Недостаток метионина в диете вызывает нарушения в обмене веществ, которые могут сопровождаться гепатическими расстройствами и вторичной гипохроматической анаэмией.

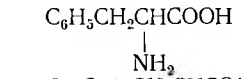
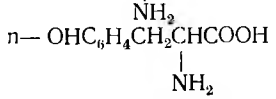
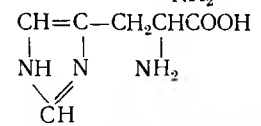
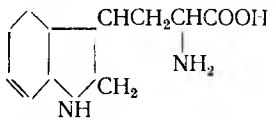
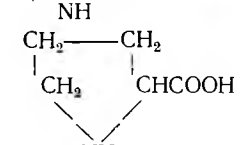
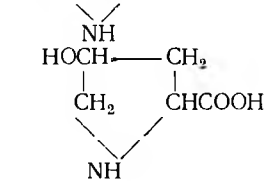
Содержание метионина в белке полноценной диеты должно составлять до 4% общего содержания белка, что соответствует 2,0—2,5 *г* метионина в день для взрослого человека и до 0,086 *г* на 1 *кг* веса для детей [10]. В связи с этим не только недостаточные по содержанию метионина белки растительного происхождения, но также и в ряде случаев белки животного происхождения, употребляемые в пищу, не всегда могут полностью удовлетворить потребность организма в метионине. В

Таблица 34

Главнейшие аминокислоты, входящие в состав белков

Наименование		Строение
	Алифатические	
Глицин (гликокол)	аминоуксусная	NH_2CH_2COOH
L-Аланин	α-аминопропионовая	$CH_3CHCOOH$ $\vert$ NH_2
L-Валин	α-аминоизовалериановая	$CH_3CH—CHCOOH$ $\vert \quad \vert$ $CH_3 \quad NH_2$
L-Лейцин	α-аминоизокапроновая	$CH_3—CHCH_2CHCOOH$ $\vert \quad \quad \vert$ $CH_3 \quad NH_2$
Изолейцин	α-амино-β-этил-β-метилпропионовая	$C_2H_5—CH—CHCOOH$ $\vert \quad \vert$ $CH_3 \quad NH_2$
L-Цистеин	α-амино-β-тиопропионовая	$HSCH_2CHCOOH$ $\vert$ NH_2
Цистин		$(SCH_2CHCOOH)_2$ $\vert$ NH_2
Метионин	α-амино-γ-метилтиол-n-масляная	$CH_3SCH_2CH_2CHCOOH$ $\vert$ NH_2
L-Серин	α-амино-β-оксипропионовая	$HOCH_2CHCOOH$ $\vert$ NH_2
D-Треонин	α-амино-β-оксимасляная	$CH_3CH—CHCOOH$ $\vert \quad \vert$ $OH \quad NH_2$
Аспарагиновая кислота	α-аминоянтарная	$HOOCCH_2CHCOOH$ $\vert$ NH_2
Глутаминовая кислота	α-аминоглютаровая	$HOOCCH_2CH_2CHCOOH$ $\vert$ NH_2
L-лизин	α, ε-диаминокапроновая	$CH_2CH_2CH_2CH_2CHCOOH$ $\vert \quad \quad \quad \quad \vert$ $NH_2 \quad \quad \quad NH_2$
Оксилизин		$CH_2—CH—CH_2CH_2CHCOOH$ $\vert \quad \vert \quad \quad \vert$ $NH_2 \quad OH \quad \quad NH_3$
L-Аргинин	α-амино-δ-гуанидил-n-валериановая	$NH{=}CNHCH_2CH_2CH_2CHCOOH$ $\vert \quad \quad \quad \quad \vert$ $NH_2 \quad \quad \quad NH_2$

Продолжение таблицы 34

Наименование		Строение
	Ароматические	
Фенилаланин	α-амино-β-фенилпропионовая	
Тирозин	α-амино-β-оксифенилпропионовая	
Гистидин	α-амино-β-имидазолилпропионовая	
Триптофан	α-амино-β-индолилпропионовая	
L-Пролин	пирролидин-α-карбоновая	
Оксипролин		

этих случаях необходимо дополнительное введение малых количеств этой аминокислоты с пищей.

Метионин применяется в качестве лечебных препаратов — смеси необходимых аминокислот, перорально или внутривенно в пост- или предоперационный период, при заболеваниях гепатического, гемопоэтического происхождения, различных интоксикациях, в том числе от применения антибиотиков, в питании, дерматологии, косметике, зоотехнии.

Лизин относится также к числу необходимых для животного организма аминокислот. В молекуле лизина имеется две аминогруппы, которые придают ему характер основания и способность образовывать стойкие соли с некоторыми кислотами. Потребность в лизине не может быть замещена D-изомером и производными и гомологами L-изомера. Дезаминированный в организме лизин почти не восстанавливается реакциями транс-

аминирования. Лизин и гидроксилизин содержатся в коллагене (до 4,8 и 0,67%, соответственно), альбумине сыворотки (до 12%), мозгу (5,8%) и других белках.

Ежедневная потребность в лизине для организма человека колеблется от 0,4 до 0,8 *г*. Особенно необходим лизин для детей. Недостаточное количество лизина в диете может вызвать потерю веса, отсутствие аппетита, атахию, нарушения нервной системы, характерное жировое перерождение печени и ряд других заболеваний. Считают, что обычная разнообразная пища полностью покрывает потребность здорового организма в лизине и только при значительных нарушениях обмена, длительном употреблении продуктов из значительно денатурированных белков вызывает необходимость дополнительного введения этой аминокислоты. Имеются данные об эффективном применении лизина при нарушении обмена кальция, витамина D, в стоматологии при зубном кариесе, для улучшения аппетита и перевариваемости пищи (увеличилась секреция пепсина и соляной кислоты).

Триптофан относится также к числу аминокислот, необходимых для организма человека и животных. Благодаря индольному кольцу ему принадлежит специфическая роль в процессах метаболизма, питания и лечения. Триптофан подвергается в организме реакциям дезаминирования и трансаминирования. Потребность в триптофане может быть частично замещена его гидроксильными и кетонными производными. Метаболизм триптофана связан со специальными процессами обмена и образования физиологически активных промежуточных продуктов, как серотонин, никотиновая кислота, куперенин и ряд других. Нарушения обмена триптофана, например, при некоторых злокачественных опухолях, сопровождается увеличением содержания серотонина и уменьшением содержания никотиновой кислоты в крови, моче больных. У здоровых людей на образование серотонина расходуется около 1% триптофана пищи, у больных карциноидной опухолью — до 60% [10].

Триптофан и гистидин проявляют бактериостатические свойства по отношению к *Mycobacterium tuberculosis hominis*, подавляя у них синтез никотиновой кислоты. Антибактериальное действие оказывают некоторые производные триптофана.

Треонин содержится в большинстве природных белков, главным образом животного происхождения. Подобно лизину, деаминированный в организме треонин не может быть восстановлен реакциями трансаминирования.

Треонин играет большую роль в процессах роста и жирового обмена, его отсутствие в диете, как и других необходимых аминокислот, вызывает нарушение азотного и белкового обмена, задержку роста, потерю аппетита, расстройства нервной и сердечной деятельности.

Потребность в L-треонине для человека приблизительно 0,5 *г* в день, но она зависит от возраста. L-треонин рекомендуется при гепатических стеатозах; он стимулирует рост животных при недостаточной диете. Благодаря наличию кислотной группы треонин образует со многими минеральными или органическими основаниями стабильные терапевтические соединения, например треоминат железа, который более эффективен, чем соль минеральных кислот или один треонин.

Лейцин, изолейцин и валин также относятся к числу аминокислот, необходимых для животного организма. Орнитин, как продукт превращения аргинина, играет важную роль в обмене веществ; он входит в состав некоторых антибиотиков (грамицидин, тироцидин).

Значительна роль в осуществлении определенных процессов обмена веществ и других аминокислот.

В основе метаболизма аминокислот лежат три главных типа реакций:

Дезаминирование: а) окислительное, сопровождаемое образованием кетокислот и аммиака; б) гидролитическое, сопровождаемое образованием оксикислот и аммиака; в) восстановительное, сопровождаемое образованием органической кислоты и аммиака.

Переаминирование, сопровождаемое синтезом новых аминокислот путем переноса аминогруппы на кетогруппу.

Декарбоксилирование, сопровождаемое расщеплением соответствующей аминокислоты до амина и CO_2.

Соответственно этому различные, в значительной степени специфические по отношению к определенным аминокислотам ферменты осуществляют указанные типы реакций обмена аминокислот — дезаминазы, аминоферазы, декарбоксилазы [10].

Многие аминокислоты, как и белки, являются пригодными источниками азота и углерода для большинства видов микроскопических грибов.

Изучение аминокислот с помощью хроматографии, колориметрии, электрофореза и других методов с использованием мутантов, полученных под воздействием радиоактивного излучения и характеризующихся разной потребностью в отдельных аминокислотах, позволило получить у грибов ряд общебиологического значения данных по их обмену. В этом отношении наиболее всесторонне изучен *Neurospora crassa* и многочисленные мутанты. Ниже приводим некоторые результаты этих исследований.

Полученные под воздействием лучевой энергии мутанты *Neurospora crassa*, нуждающиеся в определенных аминокислотах, служили моделью для изучения некоторых вопросов обмена аминокислот. Штаммы *Neurospora crassa*, нуждающиеся в метионине, треонине, гомосерине, позволили установить взаи-

мосвязь этих аминокислот в процессе метаболизма [48а, 49], а штаммы, нуждающиеся в лизине, аргинине, α-аминоадипиновой кислоте — промежуточные звенья в биосинтезе лизина [68]. Получены и изучены изолейцин- и валинзависимые штаммы [30, 100а, 101] гриба, а также нуждающиеся для роста в антраниловой кислоте, индоле и триптофане [31, 73, 91, 92], ниацине и никотиновой кислоте, аргинине, орнитине, цитрулине [55], лейцине и α-кетоизокапроновой кислоте, глицине, серине [106]. На пуринзависимых штаммах изучалось влияние гуанина, гуанозина, гуаниловой кислоты и ксантина на рост гриба [47].

Пиридинзависимые штаммы росли при добавлении в среду α-аминомасляной кислоты или треонина; значительно стимулировался рост при добавлении незначительных количеств пиримидина [46, 66, 100]. Биосинтез гистидина изучен при использовании гистидинзависимых штаммов *Neurospora crassa* [17, 18].

Метионинзависимые штаммы обладали разной способностью к росту: 1) только на среде с метионином; 2) на среде с метионином или цистином, цистатионом или гомоцистеином; 3) на среде с цистатионом, гомоцистеином, метионином; 4) на среде с метионином и гомоцистеином.

Эта их способность использована для изучения метаболизма цистеина и метионина [47].

Изучены штаммы *N. crassa* с неодинаковой способностью потребления аргинина, пролина и близких к ним соединений [48, 89]. Исследовались также ферменты, принимающие участие в метаболизме отдельных аминокислот: аминокислотные оксидазы [55], трансаминазы, дегидразы и др.

Бартон [32] испытал 17 штаммов *Neurospora crassa* и три штамма *N. sitophila* и показал, что при определенных условиях культивирования все культуры образуют с различной активностью L-аминокислотную и D-d-аминокислотную оксидазы. Отобран наиболее активный штамм и изучены условия образования L-аминокислотной оксидазы при выращивании гриба в стационарной культуре на минерально-сахарозно-казеиновой среде с биотином. Максимум образования L-аминокислотной оксидазы в мицелии и культуральной жидкости отмечен на 12-й день роста. Изучены свойства фермента и его строение. Автор предположил, что обнаруженный в ферменте связанный флавин-аденин-динуклеотид является его простетической группой.

Тэйер и Горович показали, что L-аминокислотная оксидаза *N. crassa* дезаминирует значительное число L-аминокислот до соответствующих кетокислот и аммиака. В экстрактах из мицелия выделена d-аминокислотная оксидаза, оптимум pH 8,0—8,5, фермент не угнетается цианидом, йодацетатом и бензоатом. Активно окисляет d-формы следующих аминокислот: метионина, фенилаланина, норвалина, цитрулина, аргинина, α-амино-n-масляной кислоты, лейцина, норлейцина, изолейцина

и глутаминовой кислоты. Не окисляет глицина, серина, треонина, пролина, β-аланина, β-амино-n-масляную, α-амино-α-этилмасляную, β,β-диметил-α-амино-n-масляную, N, N-диметиллейцин, лейцил-глицил и изовалин [55].

Орнитин трансаминаза у *Neurospora crassa* и ее роль в биосинтезе пролина изучались Файнгэмом [48].

Гриб выращивали поверхностным способом на минерально-сахарозной среде с микроэлементами и 0,0025 М L-аргинина. Ферментативную активность экстракта из мицелия определяли монометрическим методом в аппарате Варбурга с использованием в качестве специфических субстратов натрий-кетоглютарата, 0,2 орнитина солянокислого в атмосфере 5% CO_2 и 95% N, pH 7,3.

Орнитин трансаминаза из экстрактов мицелия гриба, по данным автора, осуществляет перенос δ-аминогруппы L-орнитина в α-кетоглутаровую кислоту, что сопровождается образованием глутаминовой кислоты и глутаминового γ-полуальдегида. По данным автора, фермент осуществляет синтез орнитина из последнего соединения и глутамата. Отмечено, в зависимости от используемых аминокислот, наличие не менее четырех трансаминаз.

Аланин-глутамат-трансаминаза проявляла низкую активность в отсутствии пиродоксалфосфата и присутствии различных экзогенных аминокислот; аспарат-глутамат-трансаминаза с высокой активностью, не всегда зависящей от наличия аминокислот, и орнитин-глутамат-трансаминаза, активность которой повышалась в 2—3 раза в присутствии аминокислот. Наблюдалась глутамат-трансаминазная активность в отношении фенилаланина, изолейцина, валина, лейцина, норлейцина, норвалина, метионина, α-амино-масляной кислоты и триптофана, которая значительно возрастала в присутствии ряда аминокислот.

Кинуренин-трансаминаза превращает кинуренин и 3-гидроксикинуренин соответственно до кинуриновой и ксантуреновой кислот [60а]. Выделена и изучена фенилпируваттрансаминаза [86].

Сериндегидраза *N. crassa* получена в концентрированном виде. Изучалось ее влияние на количественный выход пирувата и аммиака из D-серина (оптимум действия при pH 8,1—8,2) и влияние различных субстратов на активность фермента.

Выделены и изучены ферменты амидазолеацетол-фосфаттрансаминаза из гистидинзависимого штамма *Neurospora crassa* [17], триптофандесмолаза [104, 105] и некоторые другие ферменты.

Использование *N. crassa* и многочисленных мутантов позволило получить ценные в общебиологическом отношении данные о некоторых сторонах обмена аминокислот [38]. Были предложены мутанты гриба для определения отдельных аминокислот, холина, цитодина, уредина и иных соединений.

Сануэл и Лэйт [84] выделили и изучили свойства двух глутамикодегидрогеназ *Neurospora crassa.*

Ферменты выделялись из мицелия после 48 *час* роста на качалке. После отделения от культуральной жидкости мицелий замораживали при —20° С в течение 2—3 *час*, затем растирали в ступке и экстрагировали тремя объемами буфера, pH 8,5. Освобождение от остатков мицелия достигалось центрифугированием при 11 тыс. оборотов в течение 15 *мин.*

По данным авторов, одна глутамикодегидрогеназа является специфической к трифосфопиридиннуклеотиду, вторая — к ди-

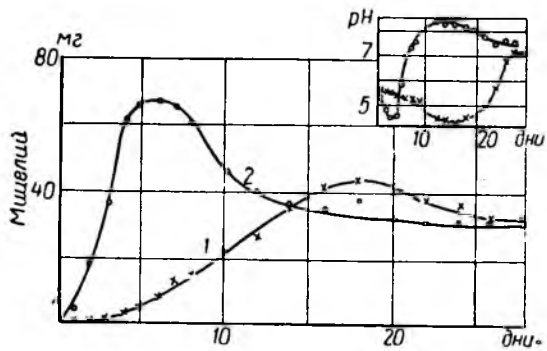


Рис. 37. Рост *Neurospora crassa* в зависимости от наличия различных аминокислот в среде:
1 — β-аланин, *2* — α-аланин; в уменьшенном масштабе — изменение pH во время роста (по Aurich).

фосфопиридиннуклеотиду. Первый фермент имеет оптимум pH 8,3, второй — 7,5. Сануэл [83, 83а] изучил также у *Fusarium oxysporum* дегидрогеназы глютаминовой кислоты. Они обладали специфичностью к трифосфопиридиннуклеотиду и дифосфопиридиннуклеотиду. Аналогичные специфические дегидрогеназы глутаминовой кислоты установлены у *Periconia orysae* [61]. В опытах Аурих [25а] установлено, что использованный автором штамм *N. crassa* гораздо лучше использует α-аланин, чем β-аланин как в присутствии, так и без пиродоксаль-5-фосфата в среде. В среде с α-аланином максимум роста гриба наблюдался на шестой, а в среде с β-аланином — на 18-й день (рис. 37). Автор предполагает, что при метаболизме α-аланина участвуют иные ферментные системы, чем при метаболизме β-аланина.

Джонс [60] показал, что у *Botrytis cinerea* накопление аминокислот в мицелии ингибируется при разобщении процессов окислительного фосфорилирования.

Реед, Хелделайн и Ванг [79] исследовали пути биосинтеза некоторых аминокислот интактными клетками *Penicillium digi-*

tatum в среде с глюкозой, меченной по углероду (C^{14}) во втором и шестом положениях. По данным авторов, аланин образуется главным образом путем переаминирования пировиноградной кислоты, возникающей при гликолизе, серин — из глицина, а глицин — из глиоксалевой кислоты, образуемой при наличии пентоз, появляющихся при разрушении фосфоглюконатов. Глутаминовая кислота образуется из промежуточных продуктов превращения глюкозы в цикле трикарбоновых кислот.

Значительное число исследований с использованием меченых аминокислот посвящено аминокислотному обмену *Penicillium chrysogenum* в связи с биосинтезом пенициллина [20, 24, 90].

Винц и Гхош [98а] изучили окисление d- и L-форм аминокислот интактными и разрушенными клетками мицелия *Pen. chrysogenum* НА-9, полученного при промышленном производстве пенициллина. Согласно их данным, при pH 2,6 все изученные L-формы аминокислот, за исключением L-пролина, окислялись быстро; при pH 7,0 окисление аминокислот, кроме цистеина, происходило после некоторого периода адаптации. D-формы сравнительно слабо окислялись, кроме D- и L-глутаминовой и D- и L-аспарагиновой кислот. Окисление разрушенными клетками происходило более интенсивно, чем целыми.

Дьюлани [40, 41] установлено образование свободного лизина в культуральной жидкости грибов *Ustilago maydis, Gliocladium* sp. *(roseum), Monochaetia unicornis, Darluca filum, Trichoderma viride* при глубинном культивировании на минерально-декстрозной среде с $NaNO_3$, $(NH_4)_2HPO_4$ или NH_4NO_3 в качестве источников азота. По данным автора, наиболее высокий выход лизина отмечен у *Ustilago maydis* — до 400 *мг/мл* среды; в последней содержатся также значительные количества аргинина и гистидина. Содержание свободных аминокислот в культуральной жидкости связано с интенсивностью роста мицелия. Автор считает, что грибы могут быть использованы для промышленного получения лизина и других аминокислот.

Курц и Эриксон [62] изучали синтез лизина, треонина видами *Ustilago* в зависимости от условий культивирования.

В связи с возможностью использования микроорганизмов для получения аминокислот Реде, Холл, Андерсон, Нельсон и др. [80] определяли содержание лизина, метионина и триптофана у бактерий, дрожжей и 135 штаммов, принадлежащих к 131 виду микроскопических грибов.

Грибы выращивали на качалке в полулитровых колбах с 140 *мл* среды, содержащей: глюкозы — 33 *г;* дрожжевого экстракта — 2,5 *г;* мочевины — 2 *г;* KH_2PO_4 — 1,5 *г;* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5 *г* в 1 *л*. Продолжительность ферментации—66 *час* при 28—29° С.

По данным авторов, содержание этих аминокислот в мицелии микроскопических грибов, так же как и азота белка, не уступает содержанию их в двух других группах изучавшихся микроорганизмов (табл. 35). Азот метионина и триптофана составляет приблизительно 1% по отношению к азоту белка. Наиболее высокий выход метионина — 2,6 *г* на 16 *г* — был у *Dematium pullulans,* триптофана — 1,5 *г* на 16 *г* белка — также у этого вида и *Humicola grisea.* Содержание лизина в мицелии колебалось от 3 *г* на 16 *г* азота у *Thelavia sepedonium* до 12,2 *г* на 16 *г* азота у *Absidia orchidis.* Изучена также потребность в аминокислотах у различных видов грибов.

Таблица 35

Суммарное среднее количество лизина, метионина и триптофана, содержащихся в бактериях, дрожжах и грибах

Группа	Число изученных штаммов	Аминокислота	Содержание азота аминокислоты
Бактерии	86	Лизин	6,50±1,97
		Метионин	1,75±0,64
		Триптофан	0,32±0,11
Дрожжи	271	Лизин	7,19±1,07
		Метионин	1,15±0,27
		Триптофан	0,80±0,23
Грибы	135	Лизин	6,75±1,49
		Метионин	1,25±0,45
		Триптофан	0,83±0,28

Количественное содержание и направленность биосинтеза аминокислот зависит от условий культивирования. Особый интерес могут представлять исследования по выявлению условий биосинтеза аминокислот, в значительном количестве выделяемых в питательную среду.

Хайн [53] изучил состав свободных аминокислот в мицелии четырех видов *Phytium*: *P. ultimum, P. arrhenomones, P. de-Baryanum, P. aphanidermatum.*

Грибы культивировали поверхностным способом в течение 10 дней на минеральной среде с глюкозой и азотнокислым натром. Свободные аминокислоты определялись в концентрированном 50%-ном этаноловом экстракте из сырого мицелия после удаления из него примесей солей. Наличие свободных аминокислот определялось хроматографически по реакции с нингидрином, а количественное определение производилось по

интенсивности окраски пятен при помощи фотовольтового денситометра.

Показано, что такие аминокислоты, как аспарагиновая, глютаминовая, серин, глицин, α-аланин, лизин, аргинин, гамма-аминобутировая, лейцин и цистеин образуют все четыре вида. *P. arrhenomones, P. aphanodermatum,* в отличие от двух других изучавшихся видов, образуют пролин и весьма незначительное количество аспарагиновой кислоты; у этих же двух видов не отмечен аспарагин и глютамин. Все четыре вида содержат цистеин, аспарагиновую кислоту и в незначительном количестве глицин (табл. 36).

Таблица 36

Встречаемость и относительные концентрации аминокислот в мицелии разных видов *Phytium*

Аминокислоты	*Ph. ultimum*	*Ph. arrhenomones*	*Ph. de-Baryanum*	*Ph. aphanidermatum*
Аспарагиновая	0,12	0,05	0,19	0,03
Глютаминовая	0,60	0,85	1,12	0,52
Серин	0,48	0,32	0,50	0,33
Глицин	0,38	0,19	0,30	0,12
Альфа-аланин	1,78	1,00	1,45	1,48
Аспарагин	0,10	—	0,15	—
Глютамин	0,15	—	0,12	—
Лизин	1,70	1,35	1,36	1,17
Аргинин	0,89	0,50	0,85	0,52
Тирозин	0,10	—	0,15	—
Гамма-аминобутировая	0,32	0,58	0,55	0,16
Валин	0,90	0,17	0,60	0,24
Лейцин	0,15	0,14	0,19	0,12
Цистеин	0,07	0,03	0,07	0,01
Пролин	—	0,30	—	0,18
Неидентифицированные аминокислоты	—	0,10	0,14	—

Мейерс, Найт [67] предложили синтетическую среду для глубинного культивирования *Penicillium roqueforti* с целью получения мицелия гриба.

Для накопления мицелия хорошими источниками азота являются аммоний и аминокислоты; нитраты менее пригодны. При росте на среде с сульфатом аммония, как единственным источником азота, *Pen. roqueforti* синтезирует аминокислоты и белки.

Авторы изучали состав аминокислот в мицелии и конидиях гриба в зависимости от условий культивирования. Аминокислоты определялись в водном экстракте из мицелия (после получасового кипячения его) методом бумажной хроматографии; для определения отдельных аминокислот применялся ряд специальных методов. Установлено наличие следующих аминокис-

лот в мицелии *Pen. roqueforti* (расположены по количественному содержанию): аланин, глютаминовая, аспарагиновая, изолейцин, лейцин, аргинин, серин. Обнаружены следы таких аминокислот, как глицин, треонин, лизин, фенилаланин, триптофан, тирозин, гистидин, метионин и валин. Пролин и оксипролин не были обнаружены. Аминокислоты составляли 5—15% общего азота в мицелии гриба и конидиях. Уровень синтеза белка и аминокислот зависит от возраста культуры гриба, условий извлечения белка и освобождения аминокислот (табл. 37). При азотном голодании увеличивается выход аминокислот в вытяжке, что, по-видимому, может быть связано с гидролизом белка и освобождением аминокислот. Авторы отмечают, что относительно продолжительный период роста мицелиальных грибов представляет интерес для изучения некоторых вопросов обмена белка и аминокислот в клетках мицелия различного возраста.

Таблица 37

Содержание азота в аминокислотном комплексе в зависимости от возраста культуры *Pen. roqueforti* при глубинном культивировании

Возраст культуры, дни	Сухой вес мицелия, *мг*	Азот аминокислот (% общего азота мицелия)
3	472	11,5
4	640	7,6
6	655	6,8
7	657	6,1
8	654	8,6
9	675	5,2

Агнихорти и Меротра [15, 16] исследовали наличие свободных и связанных аминокислот видов аспергиллов — *A. nidulans, A. violaceus, A. variecolor, A. rugulosus, A. quadriliniatus* — при культивировании на минеральной сахарозно-нитратной среде. Аспарагиновая, глутаминовая кислоты, глицин, серин, аланин, аргинин, валин, лейцин и изолейцин в свободном виде отмечены у всех изучавшихся видов; гистидин и изолейцин — только у *A. variecolor;* аминомасляная кислота отсутствует только у *A. nidulans.* Пролин и треонин находились только в связанном состоянии.

Эмильяни и де Девье [44] обнаружили значительное количество аминокислот в автолизированном мицелии *Asp. niger* — продуцента лимонной кислоты. Автолиз мицелия двух-, трехдневной культуры на минерально-сахарозной среде проводился 1%-ным раствором уксусной кислоты при анаэробиозе или температуре 48° С. При обработке одним из указанных способов мицелий теряет до 50% веса. Анализ продуктов автолиза показал наличие не только аминокислот, но и ряда других соединений — сахаров, спиртов, глюкопептидов, кислот (табл. 38). Оболочки клеток мицелия *Asp. niger* содержат полисахариды, в которых после их гидролиза обнаружены глюкоза,

маннноза, галактоза, глюкозамин и аминокислоты, главным образом аланин, серин, аспарагиновая и глутаминовая.

Цистеин может синтезироваться *Asp. nidulans* при росте на среде с сульфатами, сульфитами и тиосульфатами, а также при действии на эти соединения сухого ацетонового препарата мицелия гриба.

Таблица 38

Характеристика компонентов в автолизатах мицелия *Asp. niger*

АЗОТНЫЕ КОМПОНЕНТЫ	МНОГОАТОМНЫЕ СПИРТЫ
Аминокислоты	
Аланин	d-Маннит
Глутаминовая	d-Арабит
Глицин	l-Эритрит
Лизин	Глицерин
Фенилаланин	Инозит
Пролин	
Аргинин	КИСЛОТЫ
Серин	
Треонин	Органические
Тирозин	Лимонная
Лейцин	Янтарная
Изолейцин	Яблочная
Валин	Фумаровая
Гистидин	Аконитовая
Триптофан	Глицериновая
Цистеин	Пировиноградная
Метионин	α-Кетоглютаровая
Другие компоненты	Неорганические
Пептиды низкого молекулярного веса	Фосфорная
Аденин	Серная
Атмонин	
Протеинины	ГЛИКОПЕПТИДЫ
САХАРА И РОДСТВЕННЫЕ КОМПОНЕНТЫ	Состоят из сахаров (маннозы, глюкозы, галактозы) и аминокислот (главным образом аланина, серина, глютаминовой, аспарагиновой).
d-Глюкоза	
Фруктоза	
Рибоза	
Ксилоза	
Дигидроксиацетон	
Гликоловый ангидрид	
Глюкозамин	

Шеферд [87] установил, что ацетоновый экстракт мицелия *Asp. nidulans* содержит пиродоксаль (декарбоксилазу аминокислоты, имеющую активную группу пиридоксальфосфат) и пировиноградную или глютаминовую кислоту. Наличие этих субстратов в экстракте гриба обусловливает синтез цистеина

из минеральных источников — сульфата, сульфита и тиосульфата, который идет по схеме: сульфат→сульфит→цистеинсульфиновая кислота→цистеин.

Синтез цистеина из сульфата и сульфита повышался при добавлении пиридоксаля, пировиноградной и глутаминовой кислот. При этом отмечено, что использование глутаминовой кислоты и приводит к накоплению цистеинсульфиновой кислоты. Синтез цистеина из тиосульфата происходил без добавления этих веществ, но значительно повышался при добавлении серина и не сопровождался накоплением цистеинсульфиновой кислоты. Изучены пути биосинтеза цистеина паратиотрофными мутантами *Asp. nidulans,* полученными при УФ облучении. Мутанты отличались по потребности в различных источниках серы для прорастания конидий и роста гриба и, по мнению автора, несколько отличаются синтезом цистеина. Автором обсуждены пути биосинтеза цистеина у различных микроорганизмов.

Наличие аминокислот и некоторые вопросы их обмена у отдельных видов фузариев изучались рядом авторов. Флюк и Рихль [50], определяя в динамике наличие аминокислот в мицелии и культуральной жидкости *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici,* обнаружили 20 аминокислот и отметили связь между накоплением цитрулина, аланина и фузариевой кислоты.

Натараджан [71] исследовал аминокислоты в мицелии и культуральной жидкости *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* в зависимости от возраста и источников углеродного питания. Сануэл [83, 83а] из *Fusarium lycopersici* (=*F. oxysporum* f. *lycopersici)* выделил фермент, катализирующий превращение α-кетоглютаровой кислоты в глутаминовую. Трансаминаза гриба осуществляла перенос аминогруппы из тирозина, орнитина, аланина, метионина, лейцина, пролина, фенилаланина, триптофана, валина и аспарагиновой кислоты.

Толба и Салх [94, 95] показали, что L-метионин является непригодным источником азота для *Fusarium culmorum,* задерживает рост мицелия, энергию дыхания и синтез белка.

Эйнелли [33] изучал свободные аминокислоты в культуральной жидкости и мицелии 20 изолятов *Fusarium solani* f. *phaseoli.* Обнаружены аспарагиновая и глутаминовая кислоты, глицин, аланин, лизин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, треонин, гамма-аминобутировая кислота, глутамин. Отмечено повышение содержания глутаминовой кислоты, глицина, аланина у менее патогенных штаммов.

Билай, Закордонец [6а] установили наличие свободных аминокислот в мицелии и культуральной жидкости разных штаммов *Fusarium moniliforme* и *F. oxysporum* в минерально-сахарозной среде с нитратным азотом. Качественное определение аминокислот в водных экстрактах мицелия и культуральной жидкости культур 5, 10, 15, 20 и 30-дневного возраста проводилось методом бумажной хроматографии.

Отмечена разница в комплексе свободных аминокислот в мицелии исследуемых видов и активности их образования в зависимости от возраста культуры для отдельных штаммов. В мицелии всех штаммов *F. moniliforme* отмечено наличие глутаминовой и аспарагиновой кислот, валина, α-аланина, β-фенилаланина, лизина и триптофана. В мицелии большинства штаммов *F. moniliforme* указанные аминокислоты отмечались с пяти- до 30-дневного возраста, однако у отдельных — только с 20—30-дневного возраста. У некоторых штаммов в 20-дневном возрасте обнаружен l-цистеин.

В мицелии разных штаммов *F. oxysporum* аминокислоты обнаружены только начиная с 15—20-дневного возраста культур. Так, серии — только в 20-дневных культурах, аспарагин и l-цистеин — в 15-дневных. У штаммов *F. oxysporum* отмечено наличие неопределенных нингидринположительных веществ в 10-дневном возрасте, имеющих Rf 0,07, и в 30-дневном, имеющих Rf 0,53 (ниже валина). В то время как у культур *F. moniliforme* в мицелии лизин четко обнаруживается с пяти- до 30-дневного возраста, у штаммов *F. oxysporum* лизин отмечен (в значительно меньшей степени) только начиная с 15- до 30-дневного возраста.

В культуральной жидкости штаммов *F. moniliforme* выявлены глутаминовая, аспарагиновая кислоты, лизин и α-аланин в возрасте 5—15 дней, а у отдельных штаммов *F. oxysporum* — глутаминовая кислота, цистеин и лизин — только у пятидневных культур, аспарагиновая — у 15-дневных, а α-аланин — у 15—60-дневных.

Сэйрбгой [85] отметил, что у ряда видов *Mucorales* содержатся в свободной и связанной формах аспарагиновая, глутаминовая кислоты, глицин, серин, β-аланин. В спирторастворимой фракции из мицелия отсутствуют треонин, гистидин, изолейцин, триптофан.

Шормюллер и Гертнер [85 а] изучали интенсивность включения CO_2 (меченной по углероду) в аминокислоты мицелия *Pen. cannemberti* v. *candidum* в зависимости от возраста. Установлено, что наиболее активно углекислота включается в аспарагиновую и глутаминовую кислоты, треонин, изолейцин, аргинин, глицин, пролин. Обсуждены пути обмена аминокислот у гриба.

Хиросуке и др. [74] изучали свободные аминокислоты в мицелии и культуральной жидкости 38 изолятов *Pellicularia filamentosa,* отличающихся разной патогенностью для риса. Установлено наличие 12 свободных аминокислот.

Степанова [14] у различных по патогенности изолятов *Phytophora infestans* исследовала состав аминокислот и показала, что более патогенные штаммы отличались от менее патогенных меньшим содержанием триптофана.

Биосинтезу аминокислот отдельных видов базидиальных грибов посвящены работы ряда авторов [26, 52, 96, 99 и др.].

ЛИТЕРАТУРА

1. Безбородов А. Изучение свободных аминокислот *Actinomyces phaeochromogenus*.— Микробиология, 1959, **28**, 690.

2. Безбородов А. Изучение азотсодержащих компонентов мицелия актиномицетов.— Микробиология, 1959, **31**, 804.

3. Безбородов А., Шульц Л. Восстановление свободных аминокислот мицелия актиномицетов после азотного голодания.— Сб. экспер. и клин. исследов. по антиб. Ленингр. ин-та антиб., 1960, 11.

4. Безбородов А., Семкина А. Свободные аминокислоты в метаболизме актиномицетов.— Сб. тр. по биохим. и физиол. Горький, 1961, 41.

5. Бехтерева М. Определение аминокислот у *Actinomyces violaceus* № 719 методом бумажной хроматографии.— Микробиология, 1958, **27**, 560.

6. Білай В., Силакова А., Харкевич Е. До характеристики азотистих речовин плісневих грибів при використанні ними аміачного та нітратного азоту.— Мікробіол. ж. 1954, **16**, 20.

6а. Білай В., Закордонець Л., Вивчення свободних амінокислот у фузаріїв.— Мікробіол. ж., 1965, **27**.

6б. Вербина Н. Предварительная селекция микроорганизмов — продуцентов свободных аминокислот и последующая их дифференциация с помощью индикаторных культур.— Биосинтез аминокислот и др. биол. актив. веществ.— Тез. докл. конфер. Рига, 1964, 24.

7. Касаткина И. Влияние некоторых аминокислот на рост мутанта *Aspergillus niger* и образование им кислот.— Микробиология, **30**, 447.

8. Касаткина И., Желтова Е. Активность цистинредуктазы у *Aspergillus niger*.— Микробиология, 1963, 32, 973.

9. Красильников Н. Аминокислоты из микроорганизмов.— Усп. соврем. биол., 52, 149.

10. Майстер А. Биохимия аминокислот. Под ред. А. Брауштейна, ИЛ, М., 1961.

11. Оппель В. Изучение низкомолекулярных продуктов пепсинового расщепления гемоглобина методом хроматографии на бумаге.— Биохимия. **23**, 574.

12. Рубан Е. Биосинтез аминокислот, его практическое использование и биологическое значение.— Биосинтез аминокислот и др. биол. актив. веществ. Тез. докл. конф., Рига, 1964, 18.

13. Сорокин П., Христофоров Л., Об аминокислотном составе *Malleomyces mallei*.— Изв. Центр. вет. ин-та заразни и паразитни болести. (Болгария), 1962, **5**, 65.

14. Степанова Т. К биохимической характеристике фитофторы.— Сб. науч.-техн. информ. н.-и. ин-та картоф. х-ва, 1961, 2, 194.

14а. Суханенко Ф. Использование аргинина некоторыми грибами,— Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1959, **8**.

15. Agnihotri V., Mehrotra B. The aminoacid composition of some ascosporic members of the *Aspergillus nidulans* group.— Lloydia, 1961, **24**, 41.

16. Agnihotri V. Studies on Aspergilli. VI. The utilization of amino acids in mixtures by some ascosporic members of the *Aspergillus nidulans* group.— Mycopathol. et mycol. appl., 1962, **17**, 354.

17. Ames B., Horecker. The biosynthesis of histidine: imidazole acetol phosphate transaminase.— J. Biol. Chem., 1956, **220**, 113.

18. Ames B., Mitchell H. The paper chromatography of imidazoles.— J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 252; **75**, 1015; J. Biol. Chem., 1952, **212**, 687.

19. Anderson-Kottö I. et al. Amino acid formation and utilization in *Neurospora*.— J. Biol. Chem., 1954, **210**, 455.

20. Arnstein H., Neuberger A. The effect of cobalamin on the quantitative utilization of serine, glycine and formate for the synthesis of choline and methyl groups of methionine.— Biochem. J., 1953, **55**, 259.

21. Arnstein H., Neuberger A. The synthesis of glycine and serine by the rat.— Biochem. J., 1953, **55**, 271.

22. Arnstein H., Crawhall J. The metabolism of DL (β—C^{14}) DL—(35_s) cystine by the rat.— Biochem. J., 1953, **55**, 280.
23. Arnstein H., Grant P. The biosynthesis of penicillin. I. The incorporation of some amino acids into penicillin.— Biochem. J., 1957, **57**, 353.
24. Arnstein H., Grant P. The biosynthesis of Penicillin. The incorporation of cystine into penicillin.— Biochem. J., 1957, **57**, 360.
25. Aspen A., Meister A. Conversion of α-aminoadinic acid to l-pipecolic acid by *Aspergillus nidulans*.— Biochemistry, 1962, **1**, 606.
25a. Aurich H. Über die Assimilation von β-Alanin durch *Neurospora crassa*.— Arch. Microbiol., 1961, **39**, 221.
26. Bano Z., Srinivasan R., Srivastava H. Amino acid composition of the protein from a mushroom.— Appl. Microbiol., 1963, **11**, 184.
27. Bertrand D., Wolf A. Sur la necessité du zinc comme oligoélément pour la synthèse de quelques aminoacides chez l'*Aspergillus niger*.— C. r. Acad. Sci., 1962, **253**, 1342 .
28. Bezborodov A. Biosinteza aminoacizilor de catre actinomicete.— Ann. Rom. Sov. Biol., 1963, **17**, 78.
29. Birkinshaw J., Mohammed Y. Studies in the biochemistry of microorganisms. III. The production of 2-Phenyl-alanine anhydride (cis-L-3.6-dibenzil-2.5 dioxopiperazine) by *Penicillium nigricans* (Bainier) Thom.— Biochem. J., 1962, **85**, 523.
30. Bonner D. Further studies of mutant strains of *Neurospora requiring* isoleucine and valine.— J. Biol. Chem., 1940, **166**, 545.
31. Bonner D., Wasserman E. The conversion of N^{15}-containing indole to niacin by niacin-requiring strain.— J. Biol. Chem., 1950, **185**, 69.
32. Burton K. The L-Amino-acid oxidase of *Neurospora*.— Biochem. J., 1951, **50**, 258.
33. Mc. Anelly Ch. W. The free amino acids in the cultural media and cells of *Fusarium solani* f. *phaseoli*.— Phytopathology, 1959, **49**, 734.
34. Chattaway F., Toothill C. Intracellular free amino acids of certain dermatophytes.— Nature, 1961, **190**, 87.
35. Clayton R., Strong F. New solvent system for separation of amino acids by paper chromatography.— Anal. Chem., 1954, **26**, 1361.
36. Coval M., Horio T., Kamen M. The amino acid compositions of some bacterial haem proteins.— Biochem. et biophys. acta, 1961, **51**, 46.
37. Crossen D., Lynch D. A qualitative comparison of amino acid and sugar content of acid hydrolysates from the mycelium of several anthracnose fungi.— Phytopathology, 1958, **48**, 55.
38. Davis B. Intermediates in amino acid biosynthesis.— Adv. in Enzym., 1955, **16**, 247.
39. Davis V., Awapara I. A method for the determination of some amino-acid decarboxylases.— J. Biol. Chem., **235**, 124.
40. Dulaney E., Bilinski E., McConnell W. Extracellular organic nitrogen in *Ustilago maydis* fermentation broths.— Canad. J. Biochem. a. Physiol., 1956, **34**, 1195.
41. Dulaney E. Formation of extracellular lysine by *Ustilago maydis* and *Gliocladium* sp.— Canad. J. Microbiol., 1957, **3**, 467.
42. Dulaney E., Gray R. Penicillia that make N-formyl-hydroxyaminoacetic acid, a new fungal product.— Mycologia, 1962, **54**, 476.
43. Dulaney E. Further studies on formation of N-formyl hydroxyaminoacetic acid by Penicillium.— Mycologia, 1963, **55**, 211.
44. Emiliani E., Dawie I. Induced autolysis of *Aspergillus phoenicis* (Asp. niger group).— Appl. Microbiol., 1962, **10**, 504.
45. Ericson L., Kurz W. Microbial production of amino acids. I. The synthesis of lysine and thereonine by *Ustilago* species.— Biotechnol. a. Bioengng., 1962, **4**, 23.
46. Fairlay L. The growth-promoting effect of certain amino acids for pyrimidineless *Neurospora mutant*.— J. Biol. Chem., 1954, **210**, 347.

47. Fairley J., Loring H. Growth-promoting activities of guanine, guanosine, guanilic acid and xanthine for a purine deficient strain of *Neurospora*.— J. Biol. Chem., 1949, **177**, 451.

48. Fincham I. Ornithine-transaminase in *Neurospora* and its relation to the biosynthesis of proline.— J. Biochem., 1953, **53**, 313; Biol. J., 1953, **62**, 72.

48a. Flavin M., Slaughter C. Purification and properties of theonine synthetase of *Neurospora*.— J. Biol. Chem., 1960, **235**, 1103.

49. Fling M., Horowitz N. Threonine and homoserine in extracts of a methionineless mutant of *Neurospora*.— J. Biol. Chem., 1951, **190**, 277.

50. Flück V., Richle K. Papierchromatographische Untersuchungen über den Aminosäuren-Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici*.— Phytopathol., Zs., 1955, **24**, 455.

51. Fuerst W. Studies on the biogenesis of fusaric acid.— Phytopathol. Zs., 1957, **37**, 33.

52. Heinemann P., Casimir I. Distribution des acides amines libres dans le genze *Agaricus* Fr. sensu stricto (*Psalliota*).— Rev. mycol., 1961, 26, 24.

53. Hine R. The occurrence of amino acids in four species of *Pythium*.— Mycologia, 1960, **52**, 378.

54. Hockenhull D. The sulfur metabolism of mould fungi. The use of «biochemical mutant» strains of *Asp. nidulans* in elucidating the biosynthesis of cysteine.— Biochem. biophys. acta, 1949, **3**, 326.

55. Horowitz N. The α-amino acid oxidase of *Neurospora*.— J. Biol. Chem., 1944, **154**, 141.

56. Horowitz N. Methionine synthesis in *Neurospora*. The isolation of cystathionine.— J. Biol. Chem., 1947, **171**, 255.

57. Horowitz N. Growth inhibition of *Neurospora* by caravanine and its reversal.— J. Biol. Chem., 1948, **174**, 371.

58. Hughes D., Lynch D. Chromatographic identification of the amino acids and carbohydrates in the cultivated mushroom.— J. Agr. Food Chem., 1958, **11**, 850.

59. Jerebzoff S. L'isoleucine, facteur de rythmisme chez *Aspergillus niger* van Tieghem.— C. r. Acad. Sci., 1963, **256**, 759.

60. Jones O. T. G. The accumulation of amino acids by fungi, with particular reference to the plant parasitic fungus *Botrytis fabae*.— J. Exper. Bot., 1963, **14**, 399.

60a. Jakoby W., Bommer D. Kynurenine transaminase from *Neurospora*.— J. Biol. Chem., 1956, **221**, 689.

61. Kato K. et al. Di and triphosphopyridine nucleotide linked glumatic denydrogenases of *Periconia oryzae* and their behavior in glutamate media.— Arch. Biochem. biophys., 1962, **98**.

62. Kurz W., Ericson L. Microbial production of amino acids. II. The influence of carbon and nitrogen source and metal ions on growth of *Ustilago maydis* (DC). Cda and on lysine and threonine production.— Biotechnol. a. Biol., 1962, **4**, 37.

63. Lakshiminarayanan K. Role of cystine chelation in the mechanism of fusarium wilt of cotton.— Experientia, 1955, **11**, 388.

64. Levey A. Two dimensional chromatography of amino acids on buffered paper.— Anal. Chem., 1953, **25**, 396.

64a. Lewis R. Amino acid nutrition of *Alternaria solani*.—Phytopathology, 1957, **47**, 121.

65. Linskens H. Einflub der toxigenen Welke auf die Blattausscheidungen der Tomatpflanze.— Phytopathol. Zs., 1955, **23**, 89.

66. Loring H., Ordway G., Pierce J. A method for assay for cytidine and uridine by means of pyrimidine-deficient strain of *Neurospora*.— J. Biol. Chem., 1948, **176**, 1123.

67. Meyers E., Knight S. Studies on the intracellular amino acids of *Penicillium rogueforti*.— Mycologia, 1961, **53**, 115.

67a. Michi K., Tsuda H. Enzymatic resolution on racemic amino acids.

Hydrolysis of various N-acyl-DL-amino acids by mold acylases.— J. Bioch., Tokyo, 1958, **45**, 745.

68. Mitchell H. An intermediate in the biosynthesis of lysine in *Neurospora.*— J. Biol. Chem., 1948, **174**, 883.

69. Mora I., Snell E. The uptake of amino acids by cells and protoplasts of *S. faecalis.*— Biochemistry, 1963, **2**, 136.

70. Nakajama K. et al. Induction of nutritional mutants of glutamic acid bacteria and their amino acid accumulation.— J. Gen. a. Appl. Microbiol., 1961, **7**, 41.

70a. Nakamura T., Sato R. Cysteine-s-sulphonate as an intermediate in anicrobial synthesis of cysteine.— Nature, 1960, **185**, 163.

70b. Nakamura T. Biochemical genetic studies on the pathway of sulphate assimilation in *Aspergillus nidulans.*— J. Gen. Microbiol., 1962, **27**, 221.

71. Natarayjan S. Carbon nitrogen metabolism of soil fungi. VI. Amoni acid composition of *Fusarium vasinfectum.*— J. Indian Bot. Soc., 1958, **37**. 233. nisms.— Appl. Microbiol., 1960, **8**, 179.

72. Nelson G. Lysine, methionine and tryptophan content of microorganisms.— Appl. Microbiol., 1960, **8**, 179.

73. Nyc J., Mitchell. The use of isotopic carbon in the study of the metabolism of antranilic acid in *Neurospora.*— J. Biol. Chem., 1949, **179**, 783.

74. Хиросукэ, Сигэянсу, Тору. Изучение Pellicularia filamentosa Rog. II. Образование свободных аминокислот и сахаров у Pellicularia filamentosa.— РБЖ, 1962, 10В, 58.

75. Осяма Д. Биосинтез дипиколиновой кислоты плесенями. Изучение продуцентов дипиколиновой кислоты.— РБЖ, 1963, 7Б, 140. Rept. Ferment. Res. Ing., 1962, **21**, 103.

76. Pees E. Genetische aspecten van de lysinesynthese by *Aspergillus nidulans.*— Jenen en phanen, 1961, **6**, 25.

77. Perlman D., Obrien E. Production of glutamic acid by *Streptomycetes.*— J. Bacteriol., 1958, **75**, 611.

78. Pfenning N. Veränderungen einfacher aminostickstoffhaltiger Substanzen in Mycel und Kulturmedium Währchd des Wachstums von Streptomyces spec.— Arch. Microbiol., 1956, **25**, 109.

79. Reed D., Cheldelin V., Wang C. The biosynthesis of some amino acids in *Penicillium digitatum.*— Canad. J. Microbiol., 1958, **4**, 627.

80. Rhodes R. et al. Lysine, methionine, and tryptophan content of microorganisms.— Appl. Microbiol., 1961, **9**, 181.

81. Richmound M. The effect of amino acid analogues on growth and protein synthesis in microorganisms.— Bacteriol. Rev., 1962, **26**, 398.

82. Sandine W. et al. Studies on lysine biosynthesis by *Neurospora* and *Saccharomyces.*— Bacteriol. Proc. Amer. Bacteriol., 1960, 187.

83. Sanwal B. A study of transamination system in *Fusarium.*—Experientia, 1958, **14**, 246.

83a. Sanwal B. Diphosphopyridine nucleotide and triphosphoridine nucleotide linked glutamic dehydrogenases of *Fusarium.*—Arch. Biochem. et Biophys., 1961, **93**, 377.

84. Sanwal B., Lata M. The occurrence of two different glutamic dehydrogenases in *Neurospora.*— Canad. J. Microbiol., 1961, **7**, 319.

85. Sarbhoy A. Nutritional studies of some members of *Mucorales* IV. I. Sugars, amino- and organic acids of the mycelium.— Mycopathol. et Mycol. Appl., 1963, **19**, 37.

85a. Schormüller S., Heptner W. Stoffwechsel untersuchungen an lehensmitteltechnologisch wichtigen Mikroorganismen.— Zs. Lebensmittel-Forsh., 1964, **123**, 409.

86. Seekof R., Wagner R. Transaminase activity in *Neurospora crassa.* 1. Purification and substrate specificity of a phenylpyruvate transaminase. 2. Kinetic behavior of a phenylpyruvate transaminase.— J. Biol. Chem., 1959, **234**. 2689, 2694.

87. Shepherd C. Pathways of cystein synthesis in *Aspergillus nidulans*.— J. Gen. Microbiol., 1956, **15**, 29.

88. Siegel M., Crossan D. Effect of copper and glyodin fungicides on amino acid and sugar content and oxygen use of *Colletotrichum capsici* — Phytopathology, 1960, **50**, 680.

89. Srb A., Horowitz N. The ornithine cycle in *Neurospora* and its genetic control.— J. Biol. Chem., 1944, **154**, 129.

90. Stevens C., Vohra P., De Long C. Utilization of valine in the biosynthesis of penicillins.— J. Biol. Chem., 1954, **211**, 197.

90a. Tanenbaum S., Komeko K. Biosynthesis of dipicolinic acid and lysine in *Penicillium citreo-viride*.— Biochemistry, 1964, **3**, 1313.

91. Tatum E., Bonner D. Synthesis of tryptophane from indole and serine by *Neurospora*.— J. Biol. Chem., 1943, **151**, 349.

92. Tatum E., Bonner E., Beadme G. Anthranilic acid and the biosynthesis of indole and tryptophan by Neurospora.— Arch. Biochem., 1944, **3**, 477.

93. Thayer P., Horowitz N. The L-amino acid oxydase of *Neurospora*.— J. Biol. Chem., 1951, **192**, 755.

94. Tolba M., Salch A. Utilization of methionine by mycelial felts of *Fusarium culmorum*.— J. Exper. Bot., 1959, **10**, 146.

95. Tolba M., Salch A. Effect of organic acids on the growth, respiration and nitrogen metabolism of mycelial felt of *Fusarium culmorum*.— Arch. Microbiol., 1963, **47**, 214.

96. Touze-Soulet J. M., Montant C. Les acides amines libres du mycelium et du filtrat de culture sur divers milieux nutritifs synthétiques *d'Hypomyces aurantius* Tul.— C. Soc. biol., 1958, **152**, 874.

97. Touze J. Free amino acids of *Boletus edulis* and several closely related species.— C. r. Soc. biol., 1961, **252**, 208.

98. Tregsi G. Sulla utilizzatione di alcuni aminoacidi de parte di funghi fitopatogeni.— Ann. sperim. agrar., 1954, **8**, 6.

98a. Vinze V., Ghosh D. Oxidation of substrates by *Penicillium chrysogenum*. IV. Oxidation of amino acids.— Hindust. Antib. Bull., 1962, **5**, 37.

99. Vogel H. Lysine synthesis and phylogeny of lower fungi. Some chytrids versus Hyphochytrium.— Nature, 1961, **189**, 4769, 1026.

100. Wagner R., Bergquist A. The accumulation of keto acids and acetaldehyde by a strain of *Neurospora* inhibited by threonine.— J. Biol. Chem., 1955, **216**, 251.

100a. Wagner R., Bergquist A., Forrest H. The accumulation of acetylmethylcarbinol and acetylcarbinol by a mutant of *Neurospora crassa* and its significance in the biosynthesis of isoleucine and valine.— J. Biol. Chem., 1959, **234**, 99.

101. Wagner R., Bergquist A. Synthesis of valine and isoleucine in the presence of a particulate cell fraction of *Neurospora*.— Proc. Nat. Sci. USA, 1963, **49**, 892.

102. Whitmore L., Peterson I. Formation of extracellular amino acids and peptides in penicillin fermentations.— Arch. Biochem. Biophys., 1957, **69**, 210.

103. Wright B. Utilization of glycylic and glycolic acids by a *Neurospora* mutant requiring glycine or serine.— Arch. Biochem., 1951, **31**, 332.

104. Yanofsky C. D-serine dehydrase of *Neurospora*.— J. Biol. Chem., 1952, 343.

105. Yanofsky C. Tryptophan desmolase of *Neurospora*.— J. Biol. Chem., 1952, **194**, 279.

106. Sura T., Vogel H. An W-hydroxy-α-amino acid dehydrogenase of *Neurospora crassa*: partial purification and some properties.— J. Biol. Chem., 1959, **234**, 339.

III. токсины

К этой группе веществ, в последнее время изучаемых у многих видов микроскопических грибов, относятся различной химической природы метаболиты — кислоты, производные стеролов, ароматических соединений и др.

Токсины, образуемые различными видами микромицетов, отличаются более или менее выраженным специфическим действием на организм человека, животных, растений. К числу наиболее изученных могут быть отнесены виды грибов — возбудителей алиментарных токсикозов человека и сельскохозяйственных животных, а также ряд фитопатогенных грибов. Токсины одних видов грибов (например, *Stachybotrys alternans, Dendrodochium toxicum, Fusarium sporotrichiella)* обладают общеплазматическим токсическим действием на клетки животного и растительного организмов, других (например, *Helminthosporium victoriae)* — проявляют узкоспецифическое действие на растения определенных сортов.

Изучение токсинов микроскопических грибов развивается в нескольких направлениях: установление химической природы и роли этих метаболитов в процессах обмена веществ разных видов грибов — их продуцентов; выяснение их роли в патогенезе заболеваний человека, сельскохозяйственных животных и растений с целью рекомендации обоснованных специфических мероприятий по борьбе с ними. Исследования в этом плане имеют особо важное значение. Нередко из-за отсутствия данных по распространению определенных видов токсических грибов на пищевых и кормовых субстратах не проводятся необходимые санитарно-гигиенические мероприятия по предупреждению заболеваний, вызываемых этими грибами. В других случаях заболевания (особенно хронические) человека или сельскохозяйственных животных, причиной которых являются токсические грибы, нередко остаются незамеченными или неправильно диагностируются.

Как показали наши многолетние наблюдения [6, 8, 63—68], такие остротоксические виды грибов, как *Stachybotrys alternans, Dendrodochium toxicum, Fusarium sporotrichiella* распро-

странены довольно широко. Они могут вызывать как алиментарные токсикозы, так и пневмомикотоксикозы, возникающие обычно у людей, работающих с целлюлозосодержащим промышленным сырьем, реже — с кормами, пораженными этими видами грибов [80, 81].

В связи с этим широкая информация об установлении новых видов грибов, обладающих токсическими свойствами, особенно для человека, имеет не только научное, но и важное значение в области здравоохранения, ветеринарии.

Необходимо также отметить, что изучение специфичности действия токсинов или их отдельных компонентов на организм животных, растений и микробов может дать ценные данные о возможном практическом их использовании в качестве лечебных средств.

Если исследования в первых двух направлениях представлены значительным числом работ разных авторов, то в последнем они только начинаются. Между тем, они, несомненно, могут дать не только важные теоретические данные, но и определить область применения группы новых физиологически активных веществ. Токсины микромицетов, подобно алкалоидам высших растений, ядам животных, токсинам спорыньи, вероятно, могут применяться в медицинской практике в качестве лечебных веществ.

В настоящем разделе приводятся краткие сведения о токсинах грибов-возбудителей алиментарных токсикозов человека и сельскохозяйственных животных, условиях их биосинтеза, а также о токсинах фитопатогенных грибов.

Наряду с изучением токсинов микроскопических грибов в настоящее время проводятся широкие исследования по изучению токсинообразования *Claviceps purpurea* при культивировании в сапрофитных условиях [107, 113, 122, 130, 131, 134, 136, 155—159, 178, 209, 211, 212, 221 и др.] Также изучаются токсины видов базидальных грибов, в том числе обладающих галлюциногенными свойствами [108, 160, 181, 223 и др.].

ТОКСИНЫ ГРИБОВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ АЛИМЕНТАРНЫЕ ТОКСИКОЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Микотоксикозы — заболевания, возникающие у человека и сельскохозяйственных животных при употреблении продуктов или кормов, пораженных определенными видами токсических грибов.

Токсические свойства многих видов шляпочных грибов были установлены еще в глубокой древности. Токсичность грибов, развивающихся на продовольственных продуктах и кормах,

впервые начали изучать в XVII в., когда были установлены ядовитые свойства «рожков» (склероциев) спорыньи, развивающейся на ржи и других злаках. По литературным данным, поражение злаков грибом *Clavicerus purpurea* на протяжении многих столетий часто носило массовый характер и приводило в различных странах к возникновению эпидемий эрготизма [65].

В результате многочисленных исследований были установлены характерные признаки эрготизма, восприимчивость к нему различных животных, изучены ядовитые вещества «рожков». Обнаружение специфического действия ядовитых веществ «рожков» спорыньи на гладкую мускулатуру матки дало возможность использовать их в медицине.

В настоящее время отравления людей спорыньей практически не имеют места, но для животных они в отдельные годы все же представляют опасность. Интерес ученых к изучению биологии и физиологии гриба не ослабевает в связи с разработкой методов культивирования спорыньи для получения токсинов и изучения процессов их биосинтеза.

В конце XIX — начале XX в. русские ученые исследовали токсический гриб *Fusarium graminearum,* вызывавший на Дальнем Востоке заболевания людей при употреблении хлеба из пораженного им зерна («пьяный хлеб»). Впоследствии токсические свойства этого гриба изучались в Западной Европе и в США.

Во второй половине XIX в. и в первой четверти XX в. было проведено значительное количество исследований токсичности головневых и ржавчинных грибов для людей и сельскохозяйственных животных. Однако единого мнения о токсичности изучавшихся видов головневых грибов в литературе нет.

Остается невыясненным и вопрос о наличии токсических свойств у ржавчинных грибов, наиболее распространенных на кормовых растениях. Утверждения об их токсичности экспериментально не проверялись и, весьма вероятно, что они сильно преувеличены. Еще в большей степени это касается мучнистороснных грибов (Erysyphaceae). Сведения о наличии у них токсических свойств относятся к прошлому столетию [65].

В некоторых странах Западной Европы наблюдали отравления лошадей клевером, пораженным паразитным грибом *Polythrincium trifolii* (вызывает образование на листьях бурых пятен).

В начале XX в. описаны случаи отравления сельскохозяйственных животных в тропических и субтропических странах грибом *Claviceps paspali,* поражающим виды растений рода *Paspalum.*

За последние 15—20 лет достигнуты значительные успехи в изучении алиментарных микотоксикозов людей и сельскохозяйственных животных. Установлена роль гриба *Stachybotrys*

alternans в этиологии стахиботриотоксикоза лошадей и некоторых заболеваний людей [23], *Dendrodochium toxicum*—в этиологии дендродохиотоксикоза людей и лошадей [65], *Fusarium sporotrichiella* — в заболевании людей алиментарнотоксической алейкией [24, 71 а]. Были установлены токсические свойства и ряда других видов микроскопических грибов, поражающих корма, зерно и другие продовольственные продукты [63]. Однако многие виды грибов, довольно часто поражающих корма и продовольственные продукты, остаются непроверенными в отношении их токсичности для сельскохозяйственных животных и человека. В этом аспекте заслуживают внимания виды грибов, известные как продуценты токсических антибиотиков, например некоторые виды *Penicillium, Gliocladium* и др. Определенный интерес представляют также некоторые термотолерантные грибы *(Lichthemia, Tieghemella,* отдельные виды *Aspergillus* и др.), развивающиеся на самосогревающихся кормах и зерне [65].

Как известно, высокой токсичностью обладают патулин, глиотоксин, виридин, фумагилин и другие антибиотики, получаемые из грибов (табл. 39).

Даже относительно хорошо изученные токсические грибы *(St. alternans, D. toxicum, Fus. sporotrichiella)* являются попрежнему важным объектом исследования. Представляется весьма необходимым изучение отдельных рас и форм этих видов, продуцирующих токсические вещества, в той или иной степени отличающиеся по свойствам и по своему действию на организм человека и животных.

Стахиботриотоксины — комплекс токсинов, веществ нейтрального характера, образуемых грибом *Stachybotrys alternans,* вызывающим заболевание человека и сельскохозяйственных животных стахиботриотоксикозом. Заболевание впервые было обнаружено, примерно, в 1931 г., а в 1937—1939 гг. коллективом советских ученых установлено этиологическое значение гриба и дано ему упомянутое название [23, 28, 64, 65]. Наиболее детально в это время был изучен стахиботриотоксикоз лошадей, вызываемый токсином гриба при употреблении животными пораженного им корма (соломы, меньше — сена). До выявления токсических свойств виды рода *Stachybotrys* Bonord были описаны в литературе как сапрофитные грибы, поражающие различные целлюлозосодержащие субстраты. Пидопличко [64] описал две новые разновидности *Stachybotrys alternans — St. alternans* v. *Jathelii* *, обладающую токсическими свойствами, и *St. alternans* v. *atoxica,* не обладающую ими.

---

* Название разновидности дано в честь принимавшего участие в изучении стахиботриотоксикоза П. Д. Ятеля, который погиб во время Великой Отечественной войны.

Таблица 39

Сравнительная токсичность для лабораторных животных некоторых антибиотиков из грибов

Антибиотик	Токсичность для мышей, *мг/кг*				Примечание
	Подкожно	Внутривенно	Внутрибрюшинно	Токсичность для кроликов	
Фреквентовая кислота	—	1200	2250	—	При многократном введении—поражение почек. Слабо выводится из организма.
Цитринин	35	—	$ЛД_{50}$ 35	$ЛД_{50}$ 19 внутривенно	Повторные сублетальные дозы вызывают поражение почек у кроликов; понижается кровяное давление у собак.
Пенициллиновая кислота	110	250	110	—	В опытах на крысах оказывает антидиуретическое действие и слабое дигиталикоподобное действие на сердце.
Патулин	10—15	25—35	10—15	35	Возникают тяжелые патологические изменения органов и тканей при сублетальных дозах в острых опытах.
Гельволовая кислота	—	—	$ЛД_{50}$ 400	—	Повторное введение внутривенно или подкожно вызывает жировое перерождение печени.
Фумагилин	$ЛД_{50}$ 800	—	2000	—	
Аспергилловая кислота	—	250 (Per os)	$ЛД_{50}$ 150	—	
Коевая кислота	150 (для собак)	250 и при внутривенном, внутрибрюшинном			
Глиотоксин			$ЛД_{100}$ 45—65		
Виридин	$ЛД_{50}5$				

Стахиботриотоксикоз протекает в острой и в различной степени выраженной хронической форме, характеризующейся тремя стадиями. Наиболее специфической является вторая — лейкопеническая. В этой стадии внешние признаки поражения ротовой полости, наблюдаемые в первой фазе, могут исчезнуть

или отмечаются в различной степени. Количество лейкоцитов достигает 1—2 *тыс.* и в третьей стадии — нескольких сотен и десятков в 1 *мм*^{3} крови. Это уменьшение происходит в основном за счет нейтрофилов и гранулоцитов. Гриб остротоксичен для организма, вызывает образование некрозов в слизистых носоглотки, желудочно-кишечного тракта, точечных и пятнистых кровоизлияний в разных органах. Одним из патологоанатомических признаков является увеличение лимфатических, особенно подчелюстных желез. Для определения токсичности *St. alternans* Ятелем впервые был применен метод кожной реакции (нанесение на депилированную кожу кролика культуры гриба или экстрактов из нее).

Заболевание человека проявляется в виде зудящей сыпи, переходящей в мелкие гноящиеся очажки, или в форме пневмомикотоксикозов [40]. Возникает это обычно при соприкосновении с пораженным токсическим грибом кормом или промышленным сырьем. Аскалонов [2] установил, что к токсину данного гриба весьма чувствительны собаки, кошки, морские свинки, белые крысы и мыши, куры, голуби; в меньшей степени — овцы и козы, крупный рогатый скот. У коров отмечались потеря веса, уменьшение удоев молока, но при вскрытии убитых животных через 30 дней после начала опыта видимых патологических изменений органов не обнаруживалось. У молодняка крупного рогатого скота при длительном скармливании гриба наблюдались лейкопения и агранулоцитоз — с 19-го по 31-й день опыта количество лейкоцитов доходило до 2900, а к 50-у дню — до 960 в 1 *мм*^{3} крови, однако к концу опыта кровь была в норме.

Более детально стахиботриотоксикоз крупного рогатого скота изучался впоследствии Курмановым, Морошкиным, Измайловым, Мешковым и рядом других авторов [25, 26, 28, 39, 45, 53, 54]. Установлено, что чувствительность крупного рогатого скота к токсину гриба определяется физиологическими особенностями пищеварения жвачных и в значительной степени зависит от кормового рациона. При употреблении большого количества кислого корма не происходит инактивации токсина.

St. alternans хорошо растет на природных целлюлозосодержащих субстратах. В сильной степени поражаются грибом остатки грубых кормов из ячменной, овсяной соломы; гриб хорошо растет также на минерально-углеводных и комбинированных солевых средах с различными экстрактами. Элективной средой для выделения гриба из почвы, кормов или других субстратов может служить жидкая минеральная среда с фильтровальной бумагой как единственным источником углерода. Токсинообразование является относительно стабильным физиологическим признаком *St. alternans.*

Как свежевыделенные штаммы разного происхождения, так и длительно культивируемые сохраняют способность к токсинообразованию, которая в разной степени проявляется у отдельных штаммов [3, 64, 65, 101]. При глубинном культивировании на среде Чапека с сахарозой токсин образуется преимущественно в культуральной жидкости, при этом наибольшей токсичностью обладают эфирные и спиртовые экстракты, они же проявляют слабое антибиотическое действие.

При использовании радиоактивных по S^{35} тиомочевины, метионина, витамина В и сернокислого натра отмечено, что наилучшим образом грибом усваивается тиомочевина [27].

Стахиботриотоксин обладает также токсическим действием на растительные ткани, вызывая их некрозы и отмирание [9].

Фиалков и Серебряный [98] изучили химическую природу токсинов *St. alternans,* содержащихся в мицелии и конидиях гриба при росте на сусловом агаре в течение 30 дней.

Экстракция токсинов из мицелия проводилась эфиром, петролейным эфиром, хлороформом, этанолом 90°, ацетоном, бензолом, дистиллированной водой, 0,1-н. NaOH и 0,1-н. HCl. По данным авторов, вода и 0,1-н. HCl извлекали мало токсина. Наиболее эффективно действовали этанол, хлороформ и эфир. При извлечении веществ 0,1-н. NaOH мицелий превращался в коллоидный раствор темно-бурого цвета. Наибольшей токсичностью по реакции на кожу кролика обладал эфирный экстракт из мицелия и конидий гриба. При внутривенном введении лошади он вызывал лейкопению и другие явления, характерные для стахиботриотоксикоза.

Этим веществам авторы дали название стахиботриотоксинов.

Для выделения токсических веществ они применили метод фракционного осаждения петролейным эфиром. При первоначальном прибавлении петролейного эфира (до $^1/_3$ объема) выпадал коричневый осадок. При вторичном быстром добавлении двух-трех объемов петролейного эфира выпадал аморфный, быстро осаждающийся осадок, который многократно перекристаллизировался затем из эфира петролейным эфиром. Он обладал остротоксическими свойствами. Кроме этого, из маточных растворов был выделен еще темно-оранжевый пигмент, нерастворимый в этаноле и не обладающий токсическими свойствами. Из эфирного экстракта авторы выделили жидкое маслянистое вещество, не обладающее токсическими свойствами, в котором содержится стерин.

Из твердой части веществ в эфирном экстракте из культуры гриба выделено два вещества: стахиботриотоксин А — — $C_{25-26}H_{34-38}O_6$, растворимый в эфире и обладающий остротоксическими свойствами, и стахиботриотоксин Б, не

растворимый в воде, слабо растворимый в хлороформе, по токсическим свойствам близкий к стахиботриотоксину А.

Полученные авторами данные позволили сделать вывод о том, что в мицелии и конидиях гриба содержится комплекс токсических веществ, токсинов и стеринов.

На основании изучения некоторых химических свойств и физиологического действия стахиботриотоксина А он отнесен к новой группе природных растительных сердечных ядов типа ядов жаб и стероидных сапонинов. По химическому строению этот токсин относится к стероидам, производным пергидроциклопенантенофенантрена, имеющему лактонное кольцо, построенное по типу лактонного кольца кумарина. Авторы считают, что боковая цепь стахиботриотоксина представляет собой ненасыщенную лактонную группировку, а в ядре имеется двойная связь в четвертой гидроксильной группе, которая по реактивной способности близка с аналогичной связью холестерина и диогенина.

Пашевич [61] считает, что стахиботриотоксин имеет как связанные, но легко освобождающиеся, так и свободные кислотные группы.

Спиртовые растворы эфирного экстракта из культуры *St. alternans,* по данным Серебряной, вызывали подъем кривой сокращений изолированного сердца лягушки, т. е. в систоле, с уменьшением диастолического расслабления. При действии на изолированное ухо кролика эти растворы вызывали сужение просветов его сосудов в меньшей концентрации, чем в экспериментах с изолированным сердцем. Экстракты культур молодого возраста не обладали токсическим действием. По действию на изолированное сердце лягушки стахиботриотоксин подобен гликозидам из наперстянки.

Отдельные фракции стахиботриотоксина вызывают гемолиз эритроцитов, который не снимается добавлением холестерина, как это имеет место при действии сапонина [61, 71, 88].

У животных, больных стахиботриотоксикозом, снижается восстановительная щелочность крови, количество неорганического фосфора в крови и нарушается ретракция кровяного сгустка; последнее связано с уменьшением содержания тромбоцитов в крови [84]. В моче больных коров выявлены белок, желтые пигменты, в осадке большое количество лейкоцитов и клеток почечного эпителия [28]; обнаруживаются изменения в составе отдельных фракций белков крови: количество альбуминов значительно уменьшается, а α_1, α_2 и β_1-глобулинов увеличивается; появляется и увеличивается фракция γ_3-глобулинов. Значительно изменяется электрофоретическая подвижность отдельных фракций белков крови, наступающая раньше проявления клинических признаков заболевания крупного рогатого скота [25, 26, 28].

Стахиботриотоксин стабилен при хранении и устойчив к воздействию температуры — в течении двух часов выдерживает без значительной потери токсичности температуру 120° С. Устойчив он также и к воздействию минеральных и органических кислот, $KMnO_4$, действию света и УФ лучей. По данным Бакай [4], гриб и конидии устойчивы к воздействию радиоактивных лучей — рентгена и ультрафиолетовых. После пятичасовой экспозиции гриб не терял жизнеспособности.

Стахиботриотоксин неустойчив к воздействию щелочей — при обработке пораженной соломы или токсина 0,5%-ными растворами NaOH или KOH, 1%-ным раствором аммония происходит его инактивация.

Дендродохины — токсины, образуемые грибом *Dendrodochium toxicum* Pidopl. et Bil., впервые описанным Пидопличко и Билай при изучении заболевания лошадей дендродохиотоксикозом [63а].

D. toxicum относится к числу наиболее токсичных видов грибов. Скармливание животным грубых кормов, пораженных даже в незначительной степени, вызывает их отравление. Характерной особенностью заболевания является быстрая гибель животных — через 12—24 *час* после поедания смертельной дозы токсического корма. Последняя для лощади составляла 350—450 *г* зараженной грибом мякины. При экспериментальном дендродохиотоксикозе лошадей заболевание протекало не только в острой, но также и в затяжной форме. В последнем случае отмечалось поражение слизистых ротовой полости, отечность губ, угнетенное состояние животного, нарушение сердечной деятельности и изменение состава периферической крови, замедление седиментации эритроцитов [13].

При острой форме дендродохиотоксикоза лошадей характерными патологоанатомическими признаками являются резко выраженный цианоз слизистых, переполнение кровью органов и тканей передней части тела, очаговые инфильтраты, кровоизлияния, чаще точечного типа, почти во всех органах. Токсины гриба оказывают резко выраженное действие на нервный и гладкомышечный аппарат сердечно-сосудистой системы. При затяжной форме заболевания отмечались тяжелые некротические поражения, главным образом в отделе толстых кишок [69].

Нанесение культуры гриба или эфирных, хлороформовых спиртовых экстрактов на депилированную кожу кролика вызывает его гибель. Патологоанатомические признаки — характерные для этого заболевания. Скармливание чистой культуры гриба или экстрактов приводит к быстрой гибели многие виды лабораторных животных [63б].

Карповой-Бенуа отмечено также, что при нанесении эфирного экстракта из культуры *Dendrodochium toxicum* на депилированную кожу кролика наступает гибель животного. Ей пред-

шествуют явления гиперемии и отечности пораженного участка кожи, инъекции коронарных сосудов, поражения сердца, легких, печени. В хроническом опыте отмечен энтерит с выделением кусков слизистой ткани кишечника вместе с жидкими испражнениями. Автор считает, что по характеру действия на кожу человека токсин дендродохина напоминает поражение, вызванное ожогом от металла. При скармливании кошкам малых доз токсина отмечено глистогенное действие [30].

По данным Петровского и Петровской [62а], этаноловый экстракт из культуры гриба вызывал в зависимости от концентрации более или менее резко выраженное падение кровяного давления, угнетение деятельности сердца, расширение периферических кровеносных сосудов. Малашенко показал [42а], что систематическое или периодическое скармливание корма, зараженного минимальной дозой (0,025%) дендродохина, вызывает задержку роста крыс, потерю веса. При этом взрослые животные теряли в весе больше, чем молодые. Наиболее чувствительны к дендродохину кролики ($ЛД_{100}$ — 1,9 *мг/кг*), затем мыши ($ЛД_{100}$—7,4 *мг/кг*), морские свинки ($ЛД_{100}$ — 10,7 *мг/кг*), крысы ($ЛД_{100}$ — 13,3 *мг/кг*) при внутрибрюшинном введении. Как установили Пономаренко, Скирта и Малашенко [70], неочищенный дендродохин, элюированный с угля хлороформно-этанольной смесью, вызывает у лабораторных животных патологогистологические изменения, сходные с наблюдаемыми при естественном или экспериментальном дендродохиотоксикозе лошадей. Патоморфологическое изучение павших животных показало, что неочищенный дендродохин в острых опытах оказывает токсическое действие прежде всего на гемодинамическую систему. Оно аналогично действию корма, пораженного *D. toxicum* или действию гриба при попадании в организм респираторным путем. Кроме того, дендродохин оказывает влияние на мышечную систему бронхолегочного эластически мышечного каркаса, а также общетоксическое резорбтивное действие.

Образуется дендродохин как при поражении природных субстратов, так и при культивировании на различных средах. Богатые целлюлозой корма, растительные остатки, а также промышленное сырье при поражении грибом могут быть причиной возникновения заболевания человека и сельскохозяйственных животных.

Билай и Пидопличко [10, 11] показали, что при культивировании на среде Чапека с глюкозой, сахарозой и крахмалом как источниками углерода дендродохин образуется в мицелии и культуральной жидкости при поверхностном и глубинном методе культивирования.

При первичной изоляции дендродохина путем адсорбции на уголь из культуральной жидкости с последующей элюцией хло-

роформом, этанолом, ацетоном, метанолом установлено, что наиболее токсичными являются неочищенные препараты, элюируемые хлороформом, этанолом.

Ряд растворителей для элюции дендродохина — бутанол, воду, петролейный эфир, 0,1-н. HCl, бензол, метил-ацетат, дихлорэтан — изучил Малашенко [42]. Полученные неочищенные препараты дендродохина обладали острым токсическим действием.

В организме животных дендродохин угнетает активность ферментных систем фосфорного и окислительного обмена [43]. Так, в острых опытах отмечалось значительное снижение содержания общего и органического фосфора в тканях мышц, печени, мозга морских свинок при значительном увеличении содержания неорганического фосфора по сравнению с нормой. Содержание общего фосфора снизилось в мышцах на 18%, в печени — на 10%, в мозгу — на 6%; органического фосфора — соответственно на 15, 14, 11%, а содержание неорганического фосфора повысилось на 25, 24 и 23%.

С целью подбора тест-микроба для количественного определения дендродохина изучены его антибиотические свойства. Установлено, что спирторастворимая фракция хлороформного экстракта обладает выраженным антигрибным действием. Так, если на бактерии дендродохин оказывал антибиотическое действие в концентрации 0,6—10 *мг/мл,* то на отдельные виды мицелиальных грибов и дрожжей он действовал в концентрации 14—40 *мкг/мл.*

Дендродохин обладает антибиотической активностью в отношении отдельных видов фитопатогенных и патогенных мицелиальных грибов и дрожжей. Неочищенный дендродохин задерживает рост *Botrytis cinerea* и *Polyspora lini* в концентрации 5—20 *мкг/мл;* сапрофитные грибы более устойчивы к дендродохину. Из испытанных видов патогенных дерматофитов наиболее чувствительны к дендродохину *Trichophyton crateriforme* (14—25 *мкг/мл*), *Microsporum lanosum* (16—30 *мкг/мл*).

Из испытанных видов дрожжей наиболее чувствительными оказались *Candida stellatoidea* 63 (5—10 *мкг/мл*) и раса *Saccharomyces vini* «Феодосия» (5—10 *мкг/мл*). Эти две культуры были нами предложены в качестве теста для количественного определения дендродохина [12].

Дендродохин является характерным метаболитом гриба. Он отмечается длительное время как в культуральной жидкости, так и в мицелии гриба.

Изучение динамики биосинтеза дендродохина в культуральной жидкости и мицелии гриба в зависимости от возраста показало, что в культуральной жидкости он обнаруживается, начиная с 24 *час* до 8—9-дневного возраста при глубинном культивировании и до 60-дневного — при стационарной

культуре. Накопление дендродохина (ДІ — спирторастворимой фракции хлороформного элюата) в культуральной жидкости зависит от способа посева и ряда других факторов. Как видно из табл. 40, 41 и рис. 38, при посеве взвесью конидий макси-

Таблица 40

Накопление дендродохина в культуральной жидкости в зависимости от возраста культуры при поверхностном методе культивирования *D. toxicum*

Возраст культуры, дни	1-я серия опытов *			2-я серия опытов **		
	Исходное pH 6,0	Вес мицелия, *мг/мл*	Выход, *мкг/мл* (ФІ)	Исходное pH 6,0	Вес мицелия, *мг/мл*	Выход, *мкг/мл* (ФІ)
1	6,6	0,8	74	6,2	1,3	45
3	6,3	1,2	80	6,3	1,4	242
5	6,4	1,5	144	6,0	1,6	366
7	6,36	1,8	470	6,0	2,2	5
10	6,31	1,6	120	6,1	1,3	70
15	6,4	2,2	258	6,0	1,2	20
20	6,5	2,3	392	6,5	1,0	37
30	6,0	3,3	422	6,6	1,4	17
60	6,7	3,8	110	6,7	2,6	150

* Посев взвесью конидий в матрасы с 500 *мл* культуральной жидкостью.
** Посев инокулюмом (5 %) в матрасы с 400 *мл* культуральной жидкостью.

Таблица 41

Содержание дендродохина в культуральной жидкости в зависимости от возраста культуры при глубинном методе культивирования *D. toxicum*

Возраст культуры, дни	1-я серия опытов *			2-я серия опытов **		
	Исходное pH 6,1	Вес мицелия, *мг/мл*	Выход, *мкг/мл* (ФІ)	Исходное pH 6,0	Вес мицелия, *мг/мл*	Выход, *мкг/мл* (ФІ)
1	6,4	1,1	34	6,8	1,4	146
3	7,3	4,1	60	7,1	3,9	828,1
5	7,3	5,7	119	6,7	2,4	28
7	7,7	3,1	177	6,4	1,8	52
9	7,7	4,1	171	—	—	—

* Посев взвесью конидий.
** Посев инокулюмом 48-часовой культуры на качалке.

мальное его содержание в культуральной жидкости отмечается на седьмой, затем на 20-й и 30-й день, при посеве инокулюмом 48-часовой культуры на качалке — максимум на четвертый-пятый день. При глубинной ферментации (см. табл. 41) значи-

тельно быстрее происходит рост биомассы и накопление дендродохина; максимум отмечен на пятый день при посеве взвесью конидий и на третий день при посеве инокулюмом 48-часовой культуры на качалке. Содержание дендродохина в мицелии стационарной культуры до 30-дневного возраста составляет

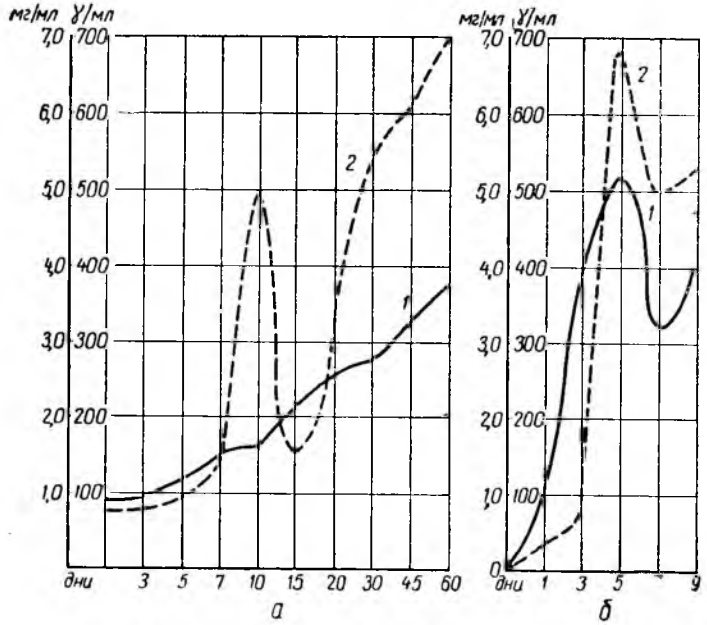


Рис. 38. Рост мицелия и образование дендродохина в культуральной жидкости и мицелии *D. toxicum* при поверхностном (*а*) и глубинном (*б*) выращивании:
1 — вес мицелия (*мг/мл*); *2* — дендродохин (*γ/мл*).

2,5—11%; в возрасте 45 дней — 38, 60 дней — 89%. При глубинном культивировании содержание его в мицелии составляет 47% в трех — пятидневном, 25% в пятидневном и 30% в девятидневном возрасте (табл. 42). Биосинтез дендродохина сопровождается подщелачиванием культуральной жидкости до pH 6,5—7,2.

Как свидетельствуют приведенные выше данные, дендродохин не оказывает токсического действия на продуцента — при значительном его накоплении в культуральной жидкости рост мицелия увеличивался с возрастом культуры.

При культивации *D. toxicum* на фильтратах культур гриба разного возраста отмечено стимулирующее действие его на рост мицелия, спорообразование и в отдельных случаях на биосинтез дендродохина (табл. 43).

Таблица 42

Соотношение между выходом дендродохина из культуральной жидкости (КЖ) и мицелия (М) при различных условиях культивирования

Продолжительность культивирования, дни	1-я серия опытов					2-я серия опытов				
	Выход дендродохина, *мг*			в %		Выход дендродохина, *мг*			в %	
	КЖ	М	Всего	КЖ	М	КЖ	М	Всего	КЖ	М
	Стационарная культура									
3	37	5	42	88,5	11,5	18	4	22	81,9	18,1
5	40	5	45	89,0	11,0	97	4	101	96,1	3,9
7	72	6	78	92,2	7,8	146	3	149	98,0	2,0
10	134	6	240	97,5	2,5	2	4	6	33,4	66,6
15	60	6	66	90,9	9,1	28	5	33	84,4	15,6
20	129	6	135	95,6	4,4	8	6	14	57,2	42,8
30	196	8	204	96,1	3,9	15	4	19	86,0	14,0
45	211	131	342	61,7	38,3	7	5	12	58,4	41,6
60	53	320	375	11,8	89,2	60	26	86	69,8	30,2
	Глубинная ферментация									
1	27	Следы	27	100	—	117	9	126	92,9	7,1
3	48	44	92	52,3	47,7	663	18	681	97,4	2,6
5	190	173	363	52,5	47,5	22	17	39	56,4	43,6
7	284	98	382	74,4	25,6	42	13	55	76,4	23,6
8	—	—	—	—	—	70	20	90	78,8	22,2
9	276	142	418	68,7	31,3					

Таблица 43

Влияние продуктов жизнедеятельности *D. toxicum* на рост его мицелия и токсинообразование

Условия опыта	Вес мицелия, *мг*	pH	Конидиеобразование	Выход дендродохина (ДИ), *мкг/мл*
Контроль — посев гриба на минерально-сахарозной среде.	370	5,61	Нет	45
Посев на фильтрате односуточной культуры	420	5,71	»	244
Посев на фильтрате двухсуточной культуры	520	6,85	»	21
Посев на фильтрате трехсуточной культуры	600	7,25	»	29
Посев на фильтрате четырехсуточной культуры	860	7,82	Обильное	31

С помощью метода сборной хроматограммы [106] изучена культуральная жидкость *D. toxicum* в разном возрасте культуры гриба при поверхностном и глубинном методах культивирования. Для восходящей хроматографии применили ленинградскую быструю (ЛБ) бумагу. На полоски фильтровальной бумаги 30×1 *см* наносили по 0,02 *мл* культуральной жидкости. После подсушивания хроматограммы обрабатывали различными растворителями, вновь просушивали для удаления последних и проявляли на газонах тест-культуры *Candida stellatoidea* 63 на сусловом агаре при 28° С через 24 *час*. Наряду с этим хроматограммы проявляли в УФ свете. Учет производили по наличию и размерам стерильных зон (рис. 39).

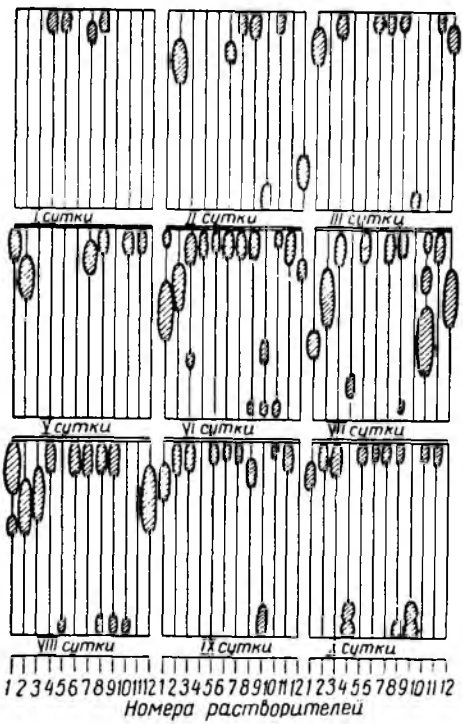


Рис. 39. Хроматограмма культуральной жидкости *D. toxicum* при глубинном культивировании в зависимости от возраста:

1 — вода дистиллированная; *2* — NH_4Cl 3%; *3* — метанол; *4* — ацетон; *5* — этил ацетат (насыщен. водой); *6* — бутанол (насыщен. водой); *7* — эфир (насыщен. водой); *8* — хлороформ; *9* — петролейный эфир; *10* — бензол; *11* — этиловый спирт (абсолютный); *12* — 0,1-н. HCl.

Хроматографическое изучение культуральной жидкости на протяжении 10 дней роста культуры гриба позволило обнаружить в ней ряд веществ. Из них основное, токсическое вещество, растворимое в хлороформе, эфире, бензоле, ацетоне, бутаноле, имеет Rf от 0,85—0,94, отмечается в культуральной жидкости на протяжении всего срока наблюдений, т. е. до 10-дневного возраста культуры при глубинном культивировании. При хроматографировании в системах вода, хлористый аммоний, соляная кислота отмечены вещества, имеющие другое Rf.

Очищенные препараты дендродохина I, дендродохина II, дендродохина III получены при различных условиях культивирования *D. toxicum* в ферментерах с полезной емкостью 24 *л* культуральной среды. При посеве инокулюмом из 30-дневной

культуры гриба на снопиках соломы и сена токсин изолировался на четвертый день роста при pH 6,8—7,3. Гриб рос в виде крупных, до 2—3 *мм* диаметром плотных шариков светлотелесного или кремоватого цвета; культуральная жидкость к этому сроку становилась светло-желтовато-золотистой, легко отделялась от мицелия.

Первичная изоляция токсина производилась хлороформом из подкисленной до pH 4,0—4,5 (1-н. HCl) культуральной жидкости с последующим удалением хлороформа при 30—35° С под вакуумом. Средний выход сырого препарата 65 *мг/л*.

Михайловлина и Степанов [12а] производили разделение неочищенного дендродохина путем хроматографии его хлороформного раствора (500 *мг* в 10—15 *мл* хлороформа) на колонке Al_2O_3 (активность второй степени) диаметром 15—16 *мм*, содержащей 30—35 *г* окиси алюминия. После проявления колонки хлороформом в верхней части ее обнаружена зона I желто-коричневого цвета, в середине — бесцветные, светящиеся при УФ облучении зоны II, III, IV, V. Элюция из каждой зоны проведена 10 *мл* этанола и элюат исследовали на биологическую активность. Максимальная токсичность отмечена в зоне IV, зоны II и III менее токсичны, а зоны I и V нетоксичны.

Дальнейшая очистка для получения индивидуальных соединений производилась путем повторной хроматографии из хлороформа. Дендродохин I получен путем трех-пятикратной хроматографии зоны IV на окиси алюминия, перекристаллизацией из смеси хлороформ — петролейный эфир (1 : 4). Выпадающее кристаллическое вещество имеет температуру плавления 324° С (разлож.), растворимо в хлороформе, бензоле, спирте, плохо растворимо в воде, нерастворимо в петролейном эфире. Спиртовый раствор имеет максимум поглощения в УФ области = 250 *мμ*, $\lg E = 3{,}61$, его формула $C_{17}H_{20}O_6$, молекулярный вес до 320 (криоскопия в бензоле). Дендродохин II получен при повторной хроматографии зоны III в виде кристаллического вещества с температурой плавления 217° С (разлож.); максимум поглощения в УФ области =262 *мμ*, $\lg E = 3{,}91$, формула $C_{14}H_{21}O_5$, молекулярный вес 269 (криоскопия в бензоле). Дендродохин I обладает значительно большей токсичностью, чем дендродохин II (табл. 44).

При посеве взвесью конидий из культур более старого возраста (до 3—12 месяцев и более) из культуральной жидкости выделяется новое вещество — дендродохин III, отличающийся значениями Rf при хроматографировании на Al_2O_3, максимумом поглощения в УФ свете и обладающий сильнее выраженными антибиотическими свойствами [105].

Таким образом, как при первичной изоляции и хроматографическом изучении культуральной жидкости разного возраста культур *D. toxicum*, так и при изоляции индивидуальных ве-

Таблица 44

Сравнительная токсичность неочищенного и кристаллических дендродохинов

Токсичность	Неочищенный дендродохин		Дендродохин I		Дендродохин II	
	БС	БЦ	БС	БЦ	БС	БЦ
Максимальная концентрация (*мкг/мл*), задерживающая рост *C. stellatoidea*	0,07	0,7	0,002	0,01	0,014	0,12
Минимальная концентрация (*мкг/мл*), дающая реакцию на коже кролика . . .	12		0,01		0,15	

БС — бактериостатическое действие; БЦ — бактерицидное.

ществ показано, что дендродохин представляет комплекс веществ. Из мицелия *D. toxicum* выделен эргостерин.

Мицелий гриба после отделения от культуральной жидкости и двух-трехкратного промывания водой экстрагировался ацетоном. Затем ацетон удаляли под вакуумом и остаток, а также мицелий обрабатывали хлороформом. После удаления хлороформа полученный коричневого цвета маслянистый остаток подвергался очистке — сперва методом колоночной инфильтрации при промывании хлороформом с 5% метанола, а затем адсорбцией на Al_2O_3 из смеси хлороформа и петролейного эфира (1 : 3) и последующей адсорбцией с постепенным уменьшением содержания петролейного эфира. После двух-трехкратной хроматографии получено кристаллическое вещество белого цвета, имеющее температуру плавления 164—165° С, положительную реакцию Либермана — Бурхарда. Вещество не обладало токсическими свойствами. При сравнительном изучении кривой поглощения спиртовых растворов полученного вещества и эргостерина в УФ области, а также их хроматографии в тонком слое (растворители — петролейный эфир : хлороформ : метанол — 100 : 50 : 10) установлена идентичность выделенного вещества с эргостерином [52].

Фузарин, спорофузарин, поин — токсины, образуемые *Fusarium sporotrichiella* и его разновидностями [6, 8]. Этиологическое значение *Fus. sporotrichiella* в заболевании людей алиментарно-токсической алейкией установлено в 1941—1945 гг. советскими учеными.

О природе этого заболевания существовали разные мнения. Одни исследователи считали, что оно является инфекционным, другие,— что возникает в результате авитаминозов организма.

В результате обстоятельного изучения данного заболевания коллективами ученых разных специальностей было установлено, что «септическая ангина» это алиментарно-токсическое заболевание с характерными фазами, наиболее специфической из которых является лейкопеническая. Отсюда и название его — алиментарно-токсическая алейкия.

Заболевание протекает или в форме острых токсикозов или с признаками алиментарно-токсической алейкии [8, 24, 29, 65, 71]. Характер токсического действия зависит от культуры гриба, условий культивирования, возраста и других факторов.

Наряду с изучением токсичности перезимовавшего в поле зерна, которое являлось причиной заболевания людей, изучалась токсичность и этиологическое значение грибов, выделенных из такого зерна. В опытах на обезьянах Рубинштейн и Лясс воспроизвели симптомокомплекс алиментарно-токсической алейкии при скармливании культуры *Fus. sporotrichiella.* Саркисов и Квашина применили методику определения токсичности зерна по реакции на депилированную кожу кролика. Авторы установили четыре вида грибов (*Phoma* sp. 263, *Hymenopsis* sp., *Fus. sporotrichiella, Aspergillus calyptatus* 225/25), дававших наиболее четко выраженную кожную реакцию при нанесении эфирных экстрактов из стерильного зерна, зараженного чистыми культурами указанных грибов. В алиментарных опытах при скармливании зараженного *Fus. sporotrichiella* зерна лабораторным животным была установлена токсичность гриба, клинические и патологоанатомические изменения, а в опытах на кошках воспроизведено заболевание, сходное с наблюдаемым при алиментарно-токсической алейкии людей [83].

Иоффе, Миронов установили токсичность *Fus. sporotrichiella* v. *poae, Cladosporium* sp. при заражении стерильного зерна чистыми культурами этих грибов [29].

Пидопличко и Билай был выявлен ряд токсических грибов при скармливании кроликам зерна, зараженного различными культурами грибов, выделенных из токсического зерна и продуктов его переработки, а также водных и эфирных экстрактов из него. [63]. Введение под кожу 0,5 *мл* водного экстракта из зерна, зараженного *Fus. sporotrichiella* или *Fus. sporotrichiella* v. *poae,* вызывало покраснение и образование некрозов, чего не наблюдалось при введении таких же экстрактов из других грибов. Установлена токсичность таких видов грибов из перезимовавшего в поле зерна: *Fus. sporotrichiella* v. *poae, Fus. lateritium, Mucor hiemalis, Mortierella polycephala, M. candelabrum, Trichoderma lignorum, Fus. sporotrichiella, Gliocladium ammoniophilum.* При этом наиболее токсичными для лабораторных животных оказались различные культуры *Fus. sporotrichiella.* Наиболее чувствительными из испытанных в острых опытах животных оказались голуби. Явления острого отравле-

ния (рвота) наступали у них при употреблении меньшего, чем для других животных количества ядовитого зерна на 1 *кг* живого веса. В хроническом алиментарном опыте на кошках и щенках с зерном, зараженным наиболее токсичной культурой (из числа испытуемых), у подопытных животных обнаружены патологические изменения, сходные с наблюдаемыми при алиментарно-токсической алейкии (ежедневная доза зараженного зерна — 0,1—0,7 *г*; продолжительность опыта — от 29 до 41 дня). В таком же опыте с менее токсичной культурой в организме подопытных животных выявлены патологические изменения, характерные для скрытых токсикозов. В первые две недели после начала скармливания отмечалась вялость, задержка роста, потеря аппетита; впоследствии состояние животных выравнивалось к видимой норме. Однако при вскрытии были отмечены патологические изменения отдельных органов, выражающиеся в наличии точечных кровоизлияний в селезенке, слизистой желудочно-кишечного тракта и других явлениях [95, 96].

Исследованиями по изучению химии ядовитых веществ зерна токсических злаков показано наличие трех фракций из эфирного или спиртового экстракта токсического зерна, обладающих различной токсичностью. Фракция жирных кислот, составляющая 80—90% исходного экстракта, оказалась наименее токсичной при кожной пробе. Нанесение ее на кожу кролика вызывало покраснение и образование быстро подсыхающей, растрескивающейся поверхностной корочки. Наиболее токсичной была фракция щелочного эфирного извлечения, составляющая 1—4% исходного экстракта. Нанесение ее на кожу вызывало отек, кровоизлияния. Фракция кислого эфирного извлечения вызывала выраженную кожную реакцию лейкоциторрейного характера [65, 84, 87а, 91].

По данным Кретович, Соседова, Швецовой и др. [36], естественно зараженное токсическое просо содержит больше небелкового и аминного азота, меньше крахмала, чем нетоксическое. В токсическом зерне сильно понижена активность ферментов декстриногенамилазы, пероксидазы, оксидазы.

Исследование масла из перезимовавшего токсического зерна [37] обнаружило повышенное кислотное и пероксидное числа, что свидетельствовало о его глубоком распаде. При экстрагировании ядовитого масла на холоде 90%-ным этанолом в последний переходит фракция жирных кислот, содержащая все ядовитое начало.

В опытах Новаковской [57] детально изучены изменения в азотистых веществах среды и зерна при заражении *Fus. sporotrichiella*, выделенными из зерна хлебных злаков в районах заболевания болезнью Кашина—Бека. Хроматографическое изучение аминокислотного состава белков показало, что при по-

ражении токсичными штаммами гриба в белках зерна отсутствуют аминокислоты ароматической группы — тирозин, триптофан, фенилаланин, а также аргинин, лизин, метионин, треонин. Данные по изменению качественного состава белка при культивировании токсического штамма *Fus. sporostrichiella* на среде с белками зерна и их гидролизатами (табл. 45, 46) свидетельствуют, что в среде после роста гриба в течение 21 дня происходят существенные изменения в белковом составе — исчезают определенные группы, или значительно уменьшается их содержание, что особенно резко выражено в отношении многих весьма важных аминокислот. Автор считает, что при гидролизе белков усвоение аминокислот токсичным штаммом *Fus. sporotrichiella* может приводить к накоплению в среде (при культивировании гриба) или зерне (при естественном заражении его) аминов.

Амины, обладающие значительным фармакологическим действием на кровеносные сосуды, по мнению автора, могут иметь значение в патогенезе болезни Кашина—Бека.

Таблица 45

Изменение состава белков среды при культивировании токсического штамма *Fus. sporotrichiella*
(Цветные реакции на белки и пептиды в питательной среде)

Вещества, добавленные в питательную среду	Цветные реакции				
	Биуретовая	Ксантопротеиновая	Миллона	Адамкевича	Сакагуши
Пробы без засева культур (контроль)					
Неизмененные белки					
ржи	++	++	++	++	+++
пшеницы	++	++	++	++	+++
казеина	++	++	++	++	+++
Гидролизаты белков					+++
ржи	++	+++	+++	++	+++
пшеницы	++	++	++	++	++
казеина	++	+++	+++	++	+++
Пробы после роста культур (21 день)					
Неизмененные белки					
ржи	Неспецифическая	+	+	+	0
пшеницы	»	+	++	0	++
казеина	»	+	++	0	++
Гидролизаты белков					
ржи	Неспецифическая	+	+	+	+
пшеницы	»	+	0	+	+
казеина	»	+	+	+	0

Таблица 46

Изменения содержания аминокислот в питательной среде под влиянием роста гриба *Fus. sporotrichiella*

Аминокислота	Наличие аминокислот в среде, содержащей гидролизат белков					
	Ржи		Пшеницы		Казеина	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Аланин	+—	++	+	++	+	++
Аргинин	+—	++	+	++	+	++
Аспарагиновая кислота	+—	++	0	++	+	++
Валин	+—	++	+	++	+	++
Гистидин	+—	++	+	++	++	++
Глицин	+	++	+	++	+	++
Глютаминовая кислота	+	++	+	++	+	++
Лейцин	0	++	0	++	0	++
Лизин	0	++	0	++	0	++
Метионин	0	++	0	++	0	++
Серин	+—	++	0	++	0	++
Тирозин	0	++	0	++	0	++
Треонин	0	++	0	++	0	++
Триптофан	0	++	0	++	0	++
Фенилаланин	0	++	0	++	0	++
Цистин	0	++	+	++	+	++

По данным Губаревых [20], фракция жирных кислот и фракция неомыляемых веществ, полученных из спиртового экстракта токсического проса, оказывают различное токсическое действие. В первом случае наблюдаются отек и гиперемия, во втором — только некротические явления. Исходя из данных этих опытов, авторы предполагают, что первый яд — «воспалительный» — состоит из дериватов жирных кислот, а второй — «некротический» — может быть отнесен к стеринам.

Олифсон [58, 59] при химическом изучении спиртовых и эфирных экстрактов из стерильного зерна проса, зараженного культурами *Fus. sporotrichiella* v. *sporotrichioides,* выделил вещество, которое он отнес к стероидальным сапонинам и назвал спорофузарином; эмпирическая формула его $C_{65}H_{36}O_{25}$. При мягком гидролизе путем нагревания в водяной бане с 5%-ной H_2SO_4 автор получил осадок, отнесенный им к сапогенину и названный спорофузариогеном. Были изучены некоторые его свойства и установлена эмпирическая формула — $C_{24}H_{31}O_4$. Оба вещества, по мнению автора, являются близкими к липотоксолу, выделенному им из токсичного зерна, перезимовавшего в поле.

Несколько отличное по химическим свойствам вещество получено Олифсоном из зерна, зараженного *Fus. sporotrichiella*

v. *poae*,— поэфузариногенин. Автор считает, что образование токсических стеролов этого типа может быть свойственно представителям секции *Sporotrichiella* рода *Fusarium*.

Из спиртового экстракта зерна, зараженного *Fus. sporotrichiella* v. *poae*, Элпидиной [102—104] получено кристаллическое вещество, названное ею поином. Установлено, что поин явля-

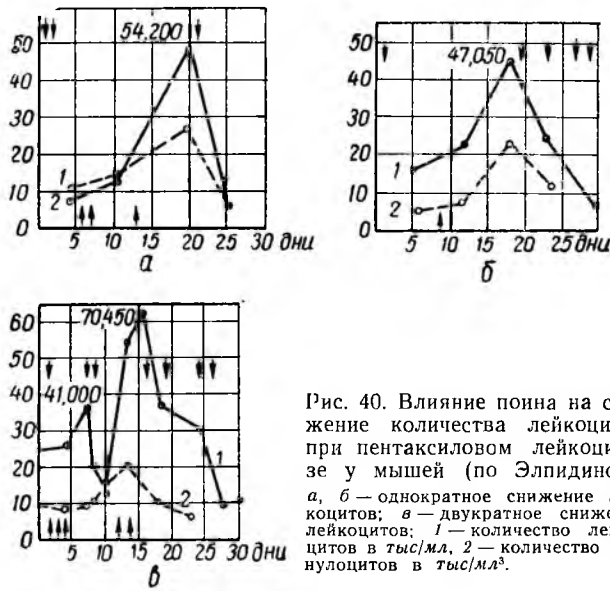


Рис. 40. Влияние поина на снижение количества лейкоцитов при пентаксиловом лейкоцитозе у мышей (по Элпидиной). *а, б* — однократное снижение лейкоцитов; *в* — двукратное снижение лейкоцитов; *1* — количество лейкоцитов в *тыс/мл*, *2* — количество гранулоцитов в *тыс/мл*³.

ется термостабильным, с температурой плавления 142—143° С; при сжигании возникает запах фурфурола; углерода содержит 59,7%, водорода — 7,77%, кислорода — 32,53%. Водный раствор токсина обесцвечивает марганцевокислый калий и метиленовую синь. Токсин обладает антибиотическим, токсическим и антилейкозным действием. При введении в больших дозах (150—135 *мг/кг*) белым мышам они гибли в течение 1—2 суток с типичными признаками острого токсикоза; употребление небольших доз (5—6 *мг/кг*) вызывало лейкопению, иногда до полного исчезновения гранулоцитов крови.

В опытах автора установлено, что поин обладает антилейкозным действием, аналогичным действию токсина, вызывающего алиментарно-токсическую алейкию, т. е. он подавляет пролиферацию миелоидных и лимфоидных клеток кроветворной системы.

Применение поина при лечении пентоксилового лейкоцитоза у мышей сопровождалось уменьшением числа лейкоцитов крови до нормы (рис. 40).

По данным автора, в опытах in vivo на мышах поин тормозил рост аденокарциномы Эрлиха и саркомы Крокера.

При изучении многочисленных культур *Fus. sporotrichiella*, выделенных из различных источников, нами было установлено, что преобладающее большинство их в разной степени токсично для организма животных. В алиментарных опытах с лабораторными животными отмечалась их гибель, при испытании кожной пробой — образование некрозов. Эфирные экстракты токсичных культур *Fus. sporotrichiella* на растительных тканях образуют некрозы и вызывают отмирание клеток. При поражении зерна мицелий гриба в значительной степени распространяется в ткани вблизи зародыша и, проникая в последний, вызывает потерю всхожести.

Фильтраты культур *Fus. sporotrichiella* оказывают угнетающее действие на рост корней и проростков овса, ячменя, риса, пшеницы на минерально-сахарозной среде. Длина корней у проростков риса в фильтратах отдельных культур достигала только 11—17% длины их в контроле. Токсическое действие на проростки злаков оказывала также и водорастворимая часть эфирного экстракта [8].

Мы испытали токсичность ряда культур этих грибов, выделенных из зерна кукурузы и почвы Канады, США и других районов. Оказалось, что эти культуры также остро токсичны.

На основании данных, полученных при изучении токсических свойств многочисленных культур секции *Sporotrichiella,* выделенных из различных источников, а также при изучении их морфологических признаков были внесены изменения в ее таксономию. Согласно этим изменениям, существовавшие виды этой секции — *Fusarium sporotrichioides, Fus. poae, Fus. tricinctum* — объединены в один вид *Fus. sporotrichiella* с тремя разновидностями. В качестве основного морфологического признака для вида принято наличие лимонновидных микроконидий в разном их соотношении с макроконидиями и цилиндрическими микроконидиями (для отдельных разновидностей). Одним из основных физиологических признаков вида является образование токсических для организма животных и растений веществ.

Наиболее пригодными источниками азота в среде для токсинообразования разными штаммами *Fus. sporotrichiella* являются сульфат-аммоний, пептон, казеин; наиболее пригодными источниками углерода — глюкоза, крахмал, маннит [83]. По данным Рубинштейн, наиболее активно токсинообразование у разных штаммов *Fus. sporotrichiella* происходило на средах с гликоколом, аланином, аспарагином, тирозином, казеином, а также с глюкозой, сахарозой и крахмалом. Тирозин, цистин, цистеин, аргинин, гистидин были мало пригодны для роста гриба. В то же время такие аминокислоты, как аспарагиновая,

глутаминовая и их амиды, аланин, гликокол, газообразный аммиак, углекислый аммоний являлись хорошими источниками азота. Культуры *Fus. sporotrichiella* обладают значительной протеолитической активностью [7].

Токсические вещества образуются в культуральной жидкости и мицелии гриба. В зависимости от штамма, условий культивирования токсичность культуральной жидкости отмечается, начиная с пятидневного и до 50—60-дневного возраста культуры. Экстракты из культуральной жидкости на среде с сахарозой и азотнокислым калием оказались более токсичными, чем полученные на такой же среде с крахмалом. Не отмечено токсичности культуральной жидкости и мицелия, при обильном росте гриба, при росте на среде с пептоном (табл. 47, 48, рис. 41).

Таблица 47

Рост мицелия и изменения pH культуральной жидкости *Fus. sporotrichiella* в зависимости от состава питательной среды и возраста (в днях)

№ среды	Источник углерода или азота в среде	Вес мицелия, *мг*						pH культуральной жидкости					
		5	10	15	30	45	75*	5	10	15	30	45	75
	Fus. sporotrichiella 24												
1	2% крахмала . .	880	1750	1190	1150	850	990	6,0	7,2	7,6	7,3	7,7	7,7
2	1% крахмала + +1% пептона .	1190	1000	1930	850	1190	1000	Больше 8,0					
3	2% сахарозы . .	610	600	510	500	640	—	3,8	4,3	5,4	6,1	6,8	7,7
	Fus. sporotrichiella v. *poae* 42												
1	2% крахмала . .	860	1250	1130	900	850	720	6,6	6,9	7,6	7,6	7,7	7,7
2	1% крахмала + +1% пептона .	1050	1090	1370	850	940	910	Больше 8,0					
3	2% сахарозы . .	610	600	510	500	640	—	3,8	4,3	5,4	6,1	6,8	7,7

* Возраст в днях.

Рубинштейн отмечает значительные различия в токсичности и характере вызываемых фузариотоксикозов у штаммов *Fus. sporotrichiella* различного происхождения. Особенно эти различия наблюдаются у штаммов, вызывающих хронические токсикозы. Так, по данным автора, при употреблении зерна, пораженного слаботоксичными штаммами гриба, отмечаются желу-

дочно-кишечные заболевания, сопровождаемые рвотой, поносом [75].

В проведенных Перкель [62], Рубинштейн [75, 76] хронических опытах на крысах со штаммами *Fus. sporotrichiella*, выделенными из злаков Забайкалья, отмечена задержка роста трубчатых и плоских костей и другие связанные с этим характерные патологические явления при отсутствии изменений со стороны крови (рис. 42, 43). Полученные данные позволили считать, что отдельные штаммы *Fus. sporotrichiella*, выделенные Рубинштейн в новую форму *Fus. sporotrichiella* f. *osteotrophica* R u b., имеют этиологическое значение при болезни Кашина—Бека («Уровская болезнь») [74, 75].

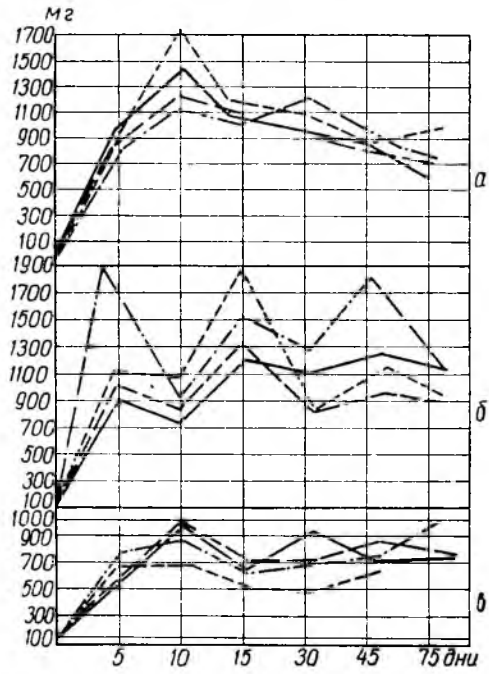


Рис. 41. Рост мицелия разных штаммов *Fus. sporotrichiella* в зависимости от состава среды и возраста культуры:
а — среда № 1; *б* — среда № 2; *в* — среда № 3.

В хронических опытах на белых крысах, которым давали вытяжку из зерна, зараженного другим штаммом *Fus. sporotrichiella*, автором отмечено постепенное развитие патологического процесса в слизистой преджелудка с образованием к концу опыта выраженного папилломатоза с гиперкератозом при отсутствии других патологических изменений и клинических признаков заболевания [77].

Токсин гриба при алиментарном или внутрибрюшинном введении мышам быстро (через 30 *мин*) обнаруживается в крови сердца и веществе головного мозга, затем в селезенке, печени, почках. Сохраняется длительно, особенно в веществе головного мозга и в почках. Предполагают, что токсину свойственен нейро-гуморальный механизм действия [16, 17].

Билай и Пидопличко [10, 11] показали, что *Fus. sporotrichiella* образует токсины при глубинном культивировании (в колбах на качалке или в ферментах с 24 *л* среды). Токсичность эфирных экстрактов из культуральной жидкости была наибольшей на четвертый день при посеве конидиями. Токсические ве-

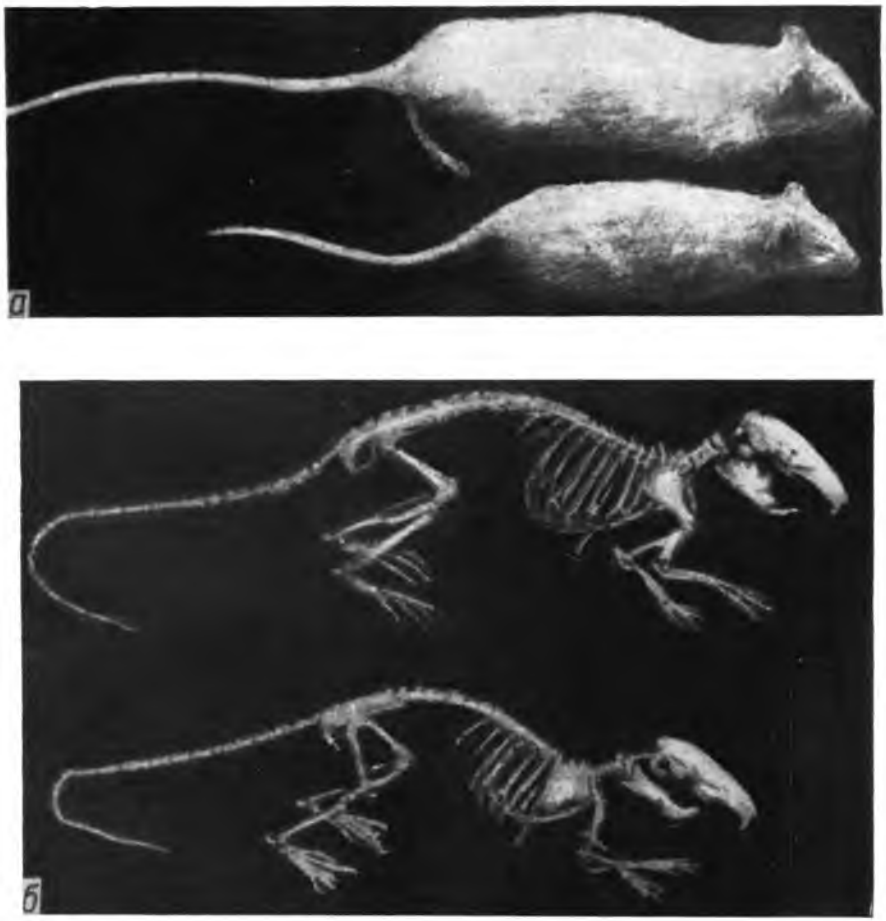


Рис. 42. Влияние *Fusarium sporotrichiella* var. *sporotrichioides* на белых крыс двухмесячного возраста (продолжительность опыта один месяц) (по Рубинштейн):

а — общий вид крыс, *б* — скелет (верхний рисунок — контроль, нижний — опыт).

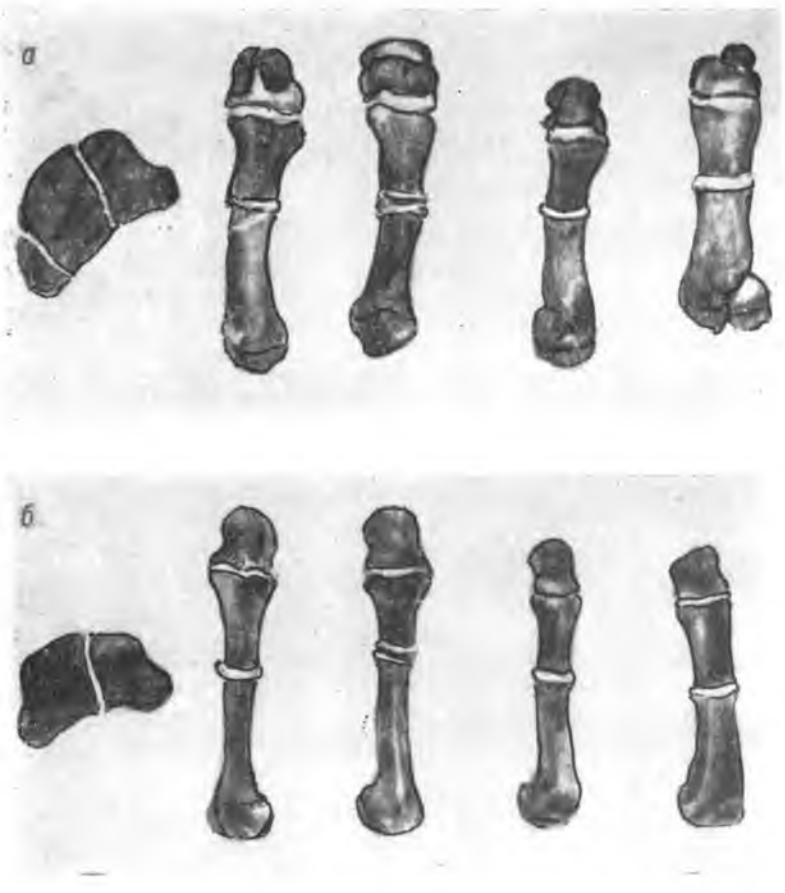


Рис. 43. Влияние *Fusarium sporotrichiella* var. *sporotrichioides* на костную ткань молодых щенят (возраст — 3 месяца, 3 недели) (по Рубинштейн):

а — кости подопытного щенка; *б* — кости контрольного щенка.

Таблица 48

Токсичность эфирных экстрактов из культуральной жидкости (КЖ) и мицелия (М) двух культур *Fus. sporotrichiella* в зависимости от состава среды и возраста (в днях)

№ среды	КЖ						М					
	5	10	15	30	45	70	5	10	15	30	45	70
Fus. sporotrichiella 1												
1	+++	++++	+++++	++	++	0	++	+++	++	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
3	+++	++	++	+	+	0	0+	0++	+++	0	0	0
Fus. sporotrichiella 2												
1	++++	+++	++	++	+	0	++	+	+	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0
3	+++	++++	++++	+++	+++	++	0	+	++	++	0	0

Примечание. (+) — незначительное покраснение кожи; (++) — покраснение и поверхностный некроз; (+++) — отек и некроз; (++++)— разлитой отек и некроз; (+++++) — разлитой некроз, отек и кровоизлияния; 0 — реакции нет.

щества адсорбировались на активированном угле или других адсорбентах и элюировались. Неочищенные препараты токсина названы авторами фузарином. Наибольшей токсичностью обладали вещества, элюируемые хлороформом, этанолом, эфиром. Фузарин термостабилен. По-видимому, токсические вещества, образуемые *Fus. sporotrichiella* и его разновидностями, так же как стахиботриотоксины и дендродохины, представляют собой комплекс веществ.

Фузариотоксикозы отмечены также у сельскохозяйственных животных — лошадей, рогатого скота, свиней [5а, 32, 85, 86].

Прентик, Диксон [190] отмечают, что выделенные ими из заплесневелого зерна ячменя (заболевание зерна, распространенное в среднезападных штатах США) штаммы различных видов фузариев образовывали рвотное вещество. В их опытах виды *Fus. moniliforme, Fus. oxysporum* v. *lycopersici, Fus. graminearum, Fus. avenaceum, Fus. poae, Fus. sporotrichioides, Fus. equiseti, Fus. culmorum* вызывали образование рвотного вещества при росте на зерне; при культивировании на среде Ричардса аналогичное действие оказывали *Fus. moniliforme, Fus. poae, Fus. culmorum,* а на мясном бульоне *Fus. nivale.* Внутривенное введение эфирных экстрактов из концентрированной культуральной жидкости голубям имело положительный токсический эффект.

Исландин, лютеоскирин — токсины из *Penicillium islandicum* Sopp.

Морука [177] отмечает значительное внимание, которое было проявлено в Японии к изучению токсичности импортного зерна риса, пораженного *Pen. islandicum.* Автор получил два токсических вещества: желтый пигмент — лютеоскирин из мицелия и токсическое вещество из культуральной жидкости. При добавлении лютеоскирина к рису, который скармливался мышам, отмечены патогистологические изменения, сходные с наблюдаемыми при скармливании зерна, пораженного грибом.

Для получения лютеоскирина наиболее активный штамм выращивали на среде Чапека с крахмалом (100 *г/л*) и кукурузным экстрактом (20 *г/л*) в течение 24 дней при 27—29° С. Токсичность фильтратов испытывали путем внутрибрюшинного введения мышам. Пигмент получали из порошка сухого мицелия путем экстракции его петролейным эфиром, затем последовательно ацетоном, растворением в воде, экстракцией хлороформом, обработкой водного раствора 2-н.HCl. Полученный при этом осадок вызывал гибель мышей при внутрибрюшинном введении в дозе 3 *мг*, в то время как экстракт из петролейного эфира даже в количестве 10 *мг* не оказывал такого действия. Эта наиболее токсическая фракция была подвергнута дальнейшей очистке на хроматографической колонке из кальций-фосфата и диатомового порошка. При использовании в качестве

растворителя метанола экстрагирован оранжевый пигмент, обладающий остротоксическими свойствами.

Гибель мышей наступала через 24 *час* после внутрибрюшинного введения пигмента в дозе 70 *мг/кг*; $ЛД_{50}$ — 47 *мг/кг*; переносимая доза 17,5 *мг/кг*.

Элементарный состав лютеоскирина — $C_{30}H_{26}O_{12}$; изучены некоторые физико-химические и биологические свойства его;

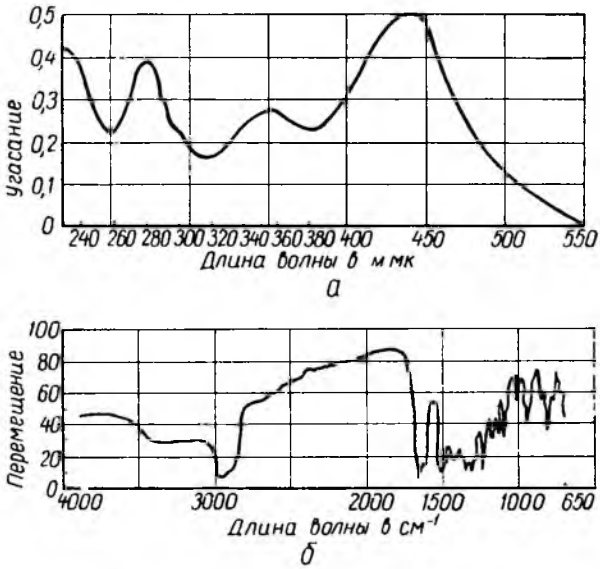


Рис. 44. Исландиотоксин (по Morooka):
Спектр поглощения ультрафиолетовых (*а*) и инфракрасных (*б*) лучей желтым пигментом *P. islandicum*.

пигмент обладает слабой антибиотической активностью; температура плавления лютеоскирина 278—279° С (разлож.). Спиртовый раствор лютеоскирина имеет три максимума в УФ области — при 280, 350, 440 *ммк*, в области инфракрасной пики при 2900, 1620, 1480, 1400, 1300, 1200, 1080, 950, 900, 800 $см^{-1}$ (рис. 44).

Значительно большей токсичностью обладало вещество, выделенное из культуральной жидкости *Pen. islandicum*.

Кобайаши и др. [168, 169] изучили токсичность для лабораторных животных зерна риса, пораженного *Pen. islandicum*. Отмечалась токсичность заплесневелого зерна как урожая риса японского происхождения, так и импортированного из Испании и США. У крыс, которым в течение месяца скармливали такой рис, при вскрытии обнаружили цирроз печени.

В опытах упомянутых коллективов авторов, состоящих из фармакологов, патологов, химиков, фитопатологов, изучалась не только токсичность пораженного *Pen. islandicum* зерна риса, но и отдельных метаболитов гриба при его культивировании.

Опыты с животными продолжались 600 дней. Токсическое действие проверялось в ранней стадии (100 дней для мышей и 140 для крыс), в промежуточной стадии (100—200 дней для мышей и 140—280 дней для крыс) и конечной стадии — до конца опыта.

При больших дозах пораженного риса (100% пораженного зерна в рационе, или 100 *мг* гриба в день) появлялись острые симптомы отравления, падал вес и наступала быстрая гибель мышей и крыс в ранней стадии. При средней дозе (30 и 10% пораженного риса в рационе, или 1—10 *мг* гриба в день) наблюдались различные симптомы — не резкая потеря веса, более продолжительная выживаемость, гибель в ранней и поздней стадии, но всегда 100%. Меньшие дозы вызывали частичную потерю веса животных в ранней фазе; смертности не отмечалось за весь период наблюдений. Однако при вскрытии у подопытных животных установлены патологические изменения органов: у крыс и мышей, получивших большие дозы токсичного зерна или гриба,— острые поражения печени, а у получивших их в малом количестве — цирроз печени.

Для испытания токсичности гриба использовались метаноловые экстракты из мицелия при подкожном и пероральном их введении в растворе камелиевого масла. Характерными патологическими изменениями печени являются ненормальная функция ее по реакции с бромсульфталеином, центролобулярные некрозы, жировое перерождение, вакуолизация ее клеток в периферических частях долек, геморрагия и др.

Исходя из характера действия метаноловых экстрактов *Pen. islandicum*, авторы считают, что данный токсин — комплексный, проявляющий как специфическое действие на печень, так и общетоксическое действие.

При изучении токсических метаболитов *Pen. islandicum* гриб выращивали на среде Чапека. Из мицелия было получено два токсических вещества — пигмент лютеоскирин и хлорсодержащий пептид.

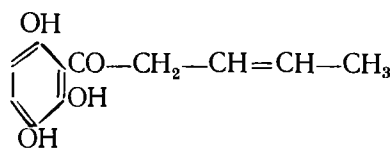
Лютеоскирин — желтые прямоугольные кристаллы, температура плавления 278° С (разлож.); оптическое вращение: $[\alpha]_D^{25°}$ 880° (0,1% в ацетоне); адсорбция в ультрафиолетовом свете: 245, 275, 430 *ммк*, $\log \varepsilon = 4{,}32$; 4,33; 4,46. Адсорбционный спектр в инфракрасном свете: 1623, 3378 $см^{-1}$. Слабо токсичен: $ЛД_{50}$ при подкожном введении 1,47 *мг* и перорально — 2,21 *мг* на 10 *г* живого веса.

Хлорсодержащий пептид — белые игольчатые кристаллы из абсолютного метанола; молекулярная формула $C_{25}H_3ON_5O_8Cl_2$, температура плавления 251—252° С (разлож.), оптическое вращение: $[\alpha]_D^{16}$ —92°·9—100°·5; адсорбция в УФ 257 *ммк*, $\log \varepsilon$ — 2,75; спектр в инфракрасном свете 3400, 1670, 1640, 1535, 1510, 1495, 1460, 695 $см^{-1}$. Проявляет остро токсическое действие; $ЛД_{50}$ при подкожном введении 4,75 *мкг* и при пероральном — 65,5 *мкг* на 10 *г* живого веса. В опытах с изолированной тканью печени этот токсин в концентрации 4 *мкг/мл* резко тормозил включение в белковую фракцию печени глицина (меченного по C^{14}). Оба токсина не оказывали заметного влияния на включение фосфора (P^{32}) в фосфолипидную и кислоторастворимую нуклеотидную фракции [219].

Мальторизин — токсин, образуемый *Asp. orysae* v. *microsporus*, изолирован и изучен Иисука и Иида [162] в связи с случаями пищевого отравления молочного скота от употребления солодовых проростков (162).

Гриб культивировался на среде Чапека-Докса с экстрактом солодовых проростков глубинным способом в течение 60 *час* при 30° С. Токсин получен путем последовательной обработки концентрированной жидкости горячим абсолютным этиловым эфиром при щелочной реакции, затем при кислой и хроматографировании этил-эфирного экстракта на колонке целлюлозы. В качестве растворителя применен *n*-бутанол, насыщенный водой. Вещество после элюции и удаления растворителя кристаллизовалось из бензола в виде светло-коричнево-желтых игл. Выход — около 2 *мг/л*, температура плавления 68,9—69,0° С (разлож.).

Молекулярная формула — $C_{11}H_{14}O_4$, структурная —



Токсичность: $ЛД_{50}$ для белых мышей при внутрибрюшинном введении — 3 *мг/кг*.

Афлатоксины (токсин FB_1) образуются в процессе жизнедеятельности штаммов *Asp. flavus* и являются причиной заболевания индюшат, утят так называемой «Х» болезнью.

При культивировании штаммов *Asp. flavus* на стерильных сырых фисташках или на синтетической среде с азотнокислым аммонием и глюкозой образуется комплекс близких по свойствам токсических веществ.

Зижден и сотрудники при помощи тонкослойной и других видов хроматографии получили кристаллическое вещество из

хлороформ-метанольного экстракта *Asp. flavus* на средах с земляным орехом или синтетической. При хроматографии на гель-целитной колонке с 0,25% этанола в хлороформе оно дает одно пятно и сине-фиолетовую флюоресценцию в УФ свете. $ЛД_{50}$ этой фракции, названной авторами «FB_1», для однодневного возраста утят равна 55 *мг*. Авторами получены инфракрасный, ядерно-магнитного резонанса и ультрафиолетовый спектры этой фракции токсина. Отмечено, что при определенных условиях она обладает фоточувствительностью. При дальнейшем изучении оказалось, что полученный кристаллический препарат содержал примеси [230].

Несбитт, О'Келли и др. [180] при хроматографии на алюминии отметили наличие двух пятен: одно, названное афлатоксином B, имело Rf приблизительно 0,6 и давало фиолетово-синюю флюоресценцию в УФ свете; второе, названное афлатоксином G, слабо подвижное, давало зеленую флюоресценцию.

В зависимости от условий культивирования гриба эти вещества выделялись в различных соотношениях. Афлатоксины B и G были разделены методом противоточного распределения в смеси хлороформ : четыреххлористый углерод : вода : метанол (2 : 2,5 : 1 : 3) и получены в кристаллическом виде.

Формула афлатоксина B — $C_{17}H_{12}O_6$; температура плавления 270° C; молекулярный вес — 312; спектр в УФ свете имеет максимумы 223, 265 и 363 *ммк*; оптическое вращение $[\alpha]\frac{25}{D}$ — 562±15. По предварительным данным, $ЛД_{50}$ для утят однодневного возраста менее 20 *мкг*.

Афлатоксин G имеет формулу $C_{17}H_{12}O_7$, максимум в УФ свете 265, 363 *ммк*; молекулярный вес — 328; оптическое вращение $[\alpha]\frac{25}{D} = -533\pm5$; $ЛД_{50}$ для однодневного возраста утят около 60 *мкг*.

Авторы указывают, что афлатоксин B представляет смесь близких соединений.

В острых и хронических опытах по изучению токсичности пораженного грибом земляного ореха отмечены характерные поражения печени — острые гепатические некрозы, увеличение ее веса, наличие метастазов, а также в отдельных опытах карциномы, т. е. гепатотоксическое и карциногенное действие [171a].

Смит и Мак Кернан [210] хроматографией хлороформного экстракта из токсичного штамма *Asp. flavus* на тонкослойном селикагеле отметили наличие около 12 фракций. Пять из них при скармливании утятам вызывали поражение печени, аналогичное с наблюдаемым при заболевании «X» болезнью.

В опытах авторов высоко токсичный штамм *Asp. flavus* выращивался в течение 9 дней при 27° C на минеральной среде с

глюкозой и азотнокислым аммонием. Из 12 четко различных зон по уровню Rf и характеру флюоресценции в УФ свете третий и четвертый компоненты составляли около 60% всего исходного токсина. Четвертый и девятый компоненты давали голубовато-зеленую, а остальные — темно-синюю флюоресценцию в УФ свете. Различно изменялся цвет отдельных компонентов при опрыскивании хроматограммы 5%-ной серной кислотой. Для биологического испытания фракции были экстрагированы хлороформом, очищены повторной хроматографией и в одинаковом весовом отношении растворены в воде. При скармливании полученных фракций однодневным утятам они заболевали через семь дней. Гистологическое изучение показало, что при скармливании третьего, четвертого, пятого и девятого компонентов токсина отмечены изменения, сходные с наблюдаемыми при «Х» болезни. Установлены различия в составе хроматографически обнаруженных компонентов токсина у сильно и средне токсичных штаммов *Asp. flavus.*

Аспергиллотоксикозы сельскохозяйственных животных в СССР и токсические свойства грибов изучал Джилавян [22].

Патурова и Гусарев [60] установили зависимость токсичности эфирного экстракта из выделенных у больных культур *Asp. clavatus* от температуры культивирования гриба (при температуре 37° С больше, чем при 18—20° С).

Тайлден, Вильямсон, Коепич [216, 216а] отмечают остро токсическое действие на почки эндотоксинов, полученных из мицелия *Asp. fumigatus* и *Asp. flavus.* В их опытах на мышах токсины вызывали характерные некрозы коркового слоя почек, а эндотоксин *Asp. fumigatus*, кроме этого, обладал также сильным гемолитическим и дермонекротическим действием на кроликов.

Уинстон и Тайлден [228] хроматографическим разделением на ДЕАЕ-целлюлозе получили из *Asp. flavus* два эндотоксина, содержащие незначительное количество гексозоамина и более высокое безазотистого сахара.

Джеквет [162а] обнаружил, кроме термолабильного токсина у культур *Asp. clavatus*, вызывающих отравления крупного рогатого скота, также термолабильный компонент, обладающий антибиотическими свойствами.

В связи с выяснением этиологии гепатитов сельскохозяйственных животных Б. Уильсон и К. Уильсон [227а] проведено изучение токсических свойств *Pen. rubrum.* В опытах перечисленных авторов был штамм гриба, изолированный из кукурузы, вызывавшей токсикозы свиней и крупного рогатого скота в США.

Для изоляции токсина гриб выращивали на увлажненном 1%-ной сахарозой стерильном зерне кукурузы в течение 14 дней при 30° С. Неочищенный препарат токсина (А) получен при

экстракции амиловым спиртом подкисленного метанолового экстракта из зараженного грибом зерна кукурузы. Из неочищенного препарата получены две фракции по их растворимости в этилацетате. Изучены некоторые физико-химические и биологические свойства.

Сопрунов и Галюлина [90] отметили, что гифы хищных видов грибов, которые поражают нематоды, выделяют вещества, вызывающие их гибель или паралич.

Ольтоф и Эстей [183] показали, что нематофагный гриб — *Arthrobotrys oligospora*, который клейкими гифами захватывает нематод и затем поражает их, выделяет токсическое вещество. В опытах авторов паралич нематод *Rhabditis* sp. наступал при погружении их в водный экстракт из пораженных грибом нематод. Фильтрат *Arthrobotrys oligospora* на среде Чапека с дрожжевым экстрактом или экстракт из непораженных нематод такого действия не оказывали.

В зависимости от экспозиции и, очевидно, от степени поражения грибом угнетающее действие на нематод было различно: при погружении в экстракт на 12—24 *час* приблизительно половина из них инактивировалась и около 30% погибало.

ТОКСИНЫ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Значительное количество исследований посвящено изучению токсических веществ фузариев — возбудителей увядания растений.

Возбудителями увядания различных растений являются более или менее специализированные формы широко распространенного вида фузариев — *Fusarium oxysporum* Schlht. Этот гриб, так же как и *Fus. moniliforme* и некоторые другие виды фузариев, нередко преобладает в почве, непосредственно прилегающей к корням растений, и на корнях здоровых растений. При проверке многих культур *Fus. oxysporum* сразу же после выделения их из почвы и корней, например, хлопчатника, некоторых зерновых злаков оказалось, что только незначительный процент общего количества испытанных является токсичным для семян и проростков растений. Фильтраты большинства культур этого гриба не оказывали токсического действия или стимулировали рост.

Виды фузариев, по сравнению со многими другими широко распространенными почвенными микромицетами проявляют определенно выраженный фитосимбиотрофизм [8а]. В связи с этим изучение различных сторон метаболизма форм *Fus. oxysporum*, выяснение их значения в метаболизме высшего растения и его устойчивости к заболеванию представляет значительный интерес.

Наиболее обстоятельные исследования по изучению условий образования, химической природы, свойств и механизма действия токсинов увядания проведены Гойманном и его учениками [18, 139—152 и др.].

Установлено, что как при культивировании, так и при определенных условиях в больном растении *Fus. oxysporum* f. *lycopersici* и иные биологические формы этого вида, а также некоторые другие виды фузариев, образуют комплекс различных по химической природе токсических веществ.

Это — дипептид-ликомаразмин, 5-*n*-бутилпиридин-2-карбоновая или фузариевая кислота, вазинфускарин, аналогичный, вероятно, пектолитическим ферментам, впоследствии обнаруженным многими авторами у различных форм этого вида. Ликомаразмин и фузариевая кислота образуются при культивировании вирулентных и невирулентных штаммов *Fus. oxysporum* f. *lycopersici,* а также in vivo в пораженном грибом растении. Их образование в растении и степень токсического действия зависят от многих условий— питания растений, устойчивости к заболеванию и других факторов.

Ликомаразмин образуется в мицелии гриба и культуральной жидкости. Отмечается с семидневного возраста культуры (10 *мг/л*), но максимальное содержание обнаруживается в полутора-двухмесячных культурах (до 200—300 *мг/л*). Он обладает узко специфическим действием: токсичен только для ткани листьев растений томатов, а также проявляет некоторое антибиотическое действие на *Lactobacillus casei.* Молекулярная формула ликомаразмина $C_9H_{15}O_7$, молекулярный вес 277.

Ликомаразмин действует специфически только на ткань листьев между главными жилками, вызывая некрозы. Он разрушает полупроницаемость плазматических мембран, что уменьшает способность клеток удерживать воду и нарушает водный баланс растения. Кроме этого, ликомаразмин образует с ионами железа железо-ликомаразминовый комплекс и тогда становится значительно токсичнее для растений томатов. Другие ионы — Mn, Mg, Co, Ni, Cu при введении с ликомаразмином в растения томатов не увеличивают его токсичности. Недостаточность железа имеет значение в чувствительности томатов к действию ликомаразмина.

Фузариевая кислота образуется в мицелии и главным образом в культуральной жидкости при выращивании на синтетической среде с глюкозой и азотнокислым аммонием. Максимум накопления в культуральной жидкости совпадает с максимумом интенсивности роста мицелия. Биосинтез фузариновой кислоты стимулируется наличием в среде цинка (рис. 45).

Молекулярная формула — $C_{10}H_{13}O_2$; молекулярный вес 179, температура плавления 98—100° С.

Чувствительность разных видов растений к фузариевой кислоте неодинакова (табл. 49). Наиболее чувствительны к ней хлопчатник и томат.

Фузариевая кислота является значительно менее специфическим токсином, чем ликомаразмин. Она задерживает рост бактерий (*Bac. subtilis, E. coli, B. megatherium, Myc. para-*

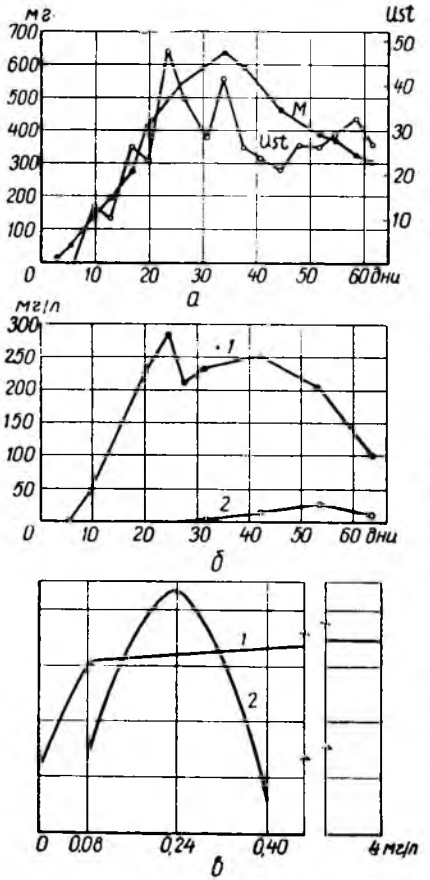


Рис. 45. Биосинтез фузариевой и дегидрофузариевой кислот в культуральной жидкости *F. oxysporum* f. *lycopersici* (по Göumann):

а — рост мицелия (*M*), и антибиотическая активность культуральной жидкости к *Ustilago zeae (Ust.)*; *б* — содержание чистой кристаллической фузариевой кислоты (*1*) и чистой кристаллической дегидрофузариевой кислоты (*2*) в культуральной жидкости; *в* — влияние цинка на образование фузариевой кислоты (цифры на оси абсцисс — *мг* цинка/*л* среды): *1* — вес сухого мицелия; *2* — антибиотическая активность культуральной жидкости.

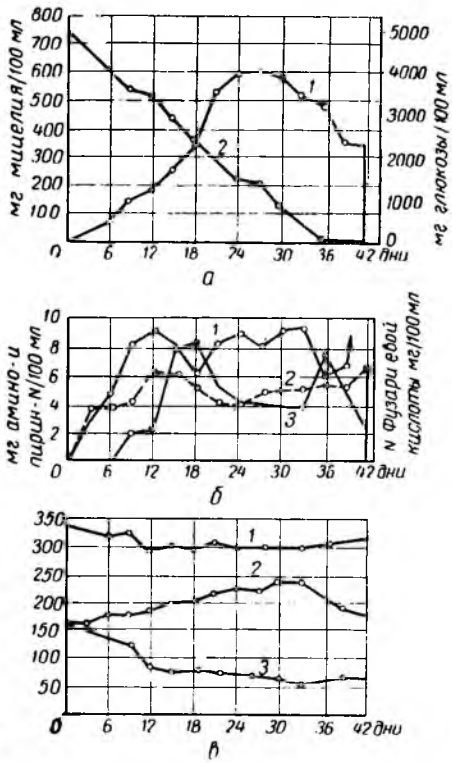


Рис. 46. Изменение содержания глюкозы и разных форм азота при биосинтезе фузариевой кислоты *F. oxysporum* f. *lycopersici* (по Sanwal):

а — рост мицелия (*1*) и содержание глюкозы (*2*) в культуральной жидкости; *б* — изменение содержания азота аминного (*1*), азота пуринов (*2*) и азота фузариевой кислоты (*3*) в культуральной жидкости; *в* — изменение содержания общего (*1*), аммонийного (*2*) и нитратного (*3*) азота в культуральной жидкости.

tuberculosis, St. aureus, Strept. faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Candida vulgaris) в концентрации от 10^{-3} до 10^{-4} М.

Чувствительны к фузариевой кислоте зеленые водоросли — *Spirogira nitida, Haematococcus* sp. и др.; она задерживает рост мицелия *Corticium vagum.*

Фузариевая кислота резко тормозит прорастание хламидоспор *Ustilago zeae* — 50% прорастания отмечается при концентрации 10^{-4} М. Это ее свойство используется для определения наличия фузариевой кислоты в культуральной жидкости.

Наряду с фузариевой кислотой при культивировании *Fus. oxysporum* f. *lycopersici* образуется также дегидрофузариевая кислота (формула — $C_{10}H_{11}O_2$, молекулярный вес 177, t° пл. 118—120° С), которая представляет собой ненасыщенную форму и появляется нередко в культуральной жидкости некоторых видов фузариевой кислоты.

Таблица 49

Чувствительность разных растений-хозяев к фузариевой кислоте

Растение	Минимальные токсические дозы, *мг/кг* живой ткани растения
Рожь	1000—2000
Кукуруза	1000—2000
Горох	1000—2000
Фасоль	100— 200
Рис	100— 200
Томат	150
Хлопчатник	10— 20

Фузариевая кислота обладает высокой степенью токсичности для разных видов растений; токсикоорганотропное ее действие проявляется в разной степени в зависимости от дозы и вида растения. Она может образовывать в растении водонерастворимые хелатные комплексы с ионами металлов.

Сэнуэл [201] с использованием меченых изотопов 2—C^{14} глицина, меченного в углероде метильной группы и C^{14} фузариевой кислоты, меченной в карбоксильной группе, изучил влияние состава среды на образование токсинов вирулентным и авирулентным штаммами *Fus. oxysporum* f. *lycopersici.*

Грибы выращивали на основной среде следующего состава: 50 *г* глюкозы, 10 *г* $(NH_4)_2NO_3$, 5 *г* KH_2PO_4; 2,5 *г* $MgSO_4$ и 0,02 *г* $FeCl_3$ на 1 *л* дистиллированной воды (pH 4,0—4,5) в течение пяти недель, а также на ее модификациях — с содержанием половины нормы азота или половины нормы углерода, или половины источников азота и углерода.

Установлено, что при уменьшении содержания азота и углерода в среде у вирулентного штамма токсинообразование происходит более интенсивно, чем у авирулентного. Использование вместо глюкозы глицина, как единственного источника углерода, приводит к уменьшению накопления в среде мицелия, но возрастает биосинтез фузариевой кислоты. При использовании аспарагиновой или глутаминовой кислоты биосинтеза фузариевой кислоты не происходит.

Динамика основных процессов метаболизма гриба при биосинтезе фузариевой кислоты приведена на рис. 46.

Автором показано, что гриб в процессе жизнедеятельности образует и выделяет в среду многие другие метаболиты — белки, аминокислоты, сахара и др. Вирулентный штамм образует почти в четыре раза больше белковых веществ.

Фузариевая кислота при введении в малых дозах (150 *мг/кг* сырого веса) усваивается растением. Около 10% ее декарбоксилируется с образованием $C^{14}O_2$ и, возможно, 3-*n*-бутилпиридина, около 30% превращается в спиртонерастворимую фракцию, около 20% — в нейтральные и основные вещества и около 30% остается неизменной; при дальнейшем уменьшении вводимой дозы содержание свободной фузариевой кислоты в ткани уменьшается. При дозе 200 *мг/кг* сырого веса растения около 77% ее превращается в растении, а при дозе 100 *мг/кг* — около 93%. Автор предполагает, что поражение растений может вызываться также образованием более токсических производных или других продуктов превращения фузариевой кислоты.

При инфильтрации в срезанные растения томатов меченной по C^{14} фузариевой кислоты в растворах с различным pH было отмечено, что при кислом pH (4,3) больше ее обнаруживается в стеблях, а при инфильтрации такой же концентрации раство-

Таблица 50

Распределение фузариевой кислоты в стеблях и листьях томатов при разном pH (в %)

pH	Время определения радиоактивности	№ опыта	Радиоактивность		
			Стебли	Листья	Потери
4,3	Сразу после заражения	1	66	27	7
		2	67	28	5
		3	65	25	10
4,3	Через 48 *час*	4	5	62	33
		5	5	59	36
		6	6	73	21
7,0	Сразу после заражения	7	47	44	9
		8	42	47	11
7,0	Через 48 *час*	9	19	67	14
		10	18	53	29

ра (150 *мг/кг*), но при pH 7,0 она преобладала в листьях. Как видно из табл. 50, в последующие 48 *час* инфильтрации значительное количество кислоты перемещается из листьев в стебли. При этом локализация ее в тканях сопровождается проявлением внешних симптомов поражения, характерных при заболевании увяданием.

Фузариевая кислота принадлежит к неустойчивым соединениям. Так, при инфильтрации в побеги томатов 120 *мг/кг* сырого веса меченой кислоты через 48 *час* остается неизменной только до 7% ее, остальное количество подвергается различным превращениям в растении, причем степень превращения зависит от величины первоначальной дозы.

Нисимура [182а] установил, что многие штаммы *Fusarium oxysporum* и *F. moniliforme,* различного происхождения, обладают способностью образовывать фузариевую кислоту, вызывающую увядание различных растений.

Эта кислота обнаружена в растениях хлопчатника, томатов при заражении почвы вирулентными штаммами грибов *F. oxysporum* [163, 164, 171 и др.].

При искусственном заражении почвы *Fus. oxysporum* f. *vasinfectum* отмечена различная степень накопления кислоты в зависимости от типа почвы и других факторов. Так, инактивация ее в нестерильной почве значительно больше, чем в стерильной почве и песке [164].

В зависимости от условий и степени токсичности продуцента, концентрации в тканях растения фузариевая кислота различным образом влияет на водный обмен растения и увядание. При высокой дозе токсина (100—200 *мг/кг* сырого веса в течение первого часа) водообмен парализуется сразу и восстанавливается наполовину через три—пять часов; при низкой дозе (20 *мг/кг*) подача воды в ткань повышается, наряду с поступлением идет и транспирация, и в первую фазу интоксикации растения томатов не страдают от недостатка воды. Нарушение водного обмена наступает после появления некрозов в тканях, когда траспирация преобладает над поступлением воды, что приводит к уменьшению ее содержания в клетках и потере их тургора.

Гойманн считает, что фузариевая кислота, образуемая грибом при поражении растения и вовлекаемая в транспирационные токи, может оказывать патологическое действие многими путями. При декарбоксилировании в больном растении из фузариевой кислоты образуется 3-*n*-бутилпиридин, токсическое действие которого в 100 раз большее, чем неизмененной кислоты. Наоборот, при метилировании атома азота в пиридиновом кольце фузариевой кислоты образуется амидная форма ее, нетоксичная для растения (рис. 47).

Образование амидной формы фузариевой кислоты в растении автор рассматривает как защитную реакцию самого растения.

В устойчивых к увяданию сортах нейтрализуется указанными путями до 24% введенной в ткани фузариевой кислоты, а в чувствительных сортах реакцией метилирования обезвреживается только 8—9% ее.

Пиридиновое кольцо фузариевой кислоты в низких концентрациях нарушает в протопласте некоторых растений окислительное фосфорилирование, а алифатическая боковая цепь ее в β-положении, наоборот, в более высокой концентрации повреждает цитохромоксидазу. Кислота и ее производные оказывают влияние на активность окислительных ферментов.

При функционировании в транспирационном токе фузариевая кислота и ее производные изменяют водопроницаемость протопластов клеток тканей растения-хозяина. Это действие зависит от чувствительности ткани растения, концентрации кислоты или ее производных, условий питания растения, его устойчивости и других факторов.

По данным Гойманна, фузариевая кислота, образуемая грибом при поражении растения, является одним из факторов, вызывающих заболевание растений увяданием.

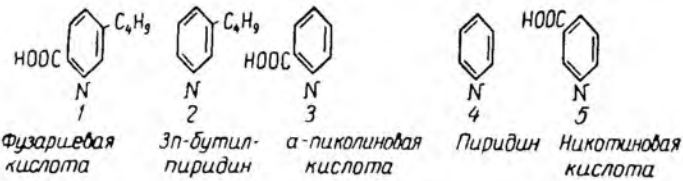


Рис. 47. Возможные превращения молекулы фузариевой кислоты в растении, пораженном *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (по Göumann).

Пептидоподобное вещество кульмомаразмин, обладающее фитотоксическими свойствами, изолировано из культуральной жидкости *Fus. culmorum* [167а]. Брайэн с сотрудниками [116] изолировали в кристаллическом виде из культуральной жидкости *Fus. equiseti* (Corda) два фитотоксических вещества — диацетоксисцирпенол и сцирпентиол. В опытах авторов остротоксическое действие на бобовые оказывал диацетоксисцирпенол, который, по их мнению, может быть также токсичен для животных.

Виктотоксинин (виктотоксин) образуется *Helminthosporium victoria* — возбудителем пятнистости листьев овса. Токсин обладает узкой специфичностью действия, оказывает токсическое действие на чувствительные сорта овса [170].

Сорт овса *(Avena bysantina* C. Koch) Виктория был в 1927 г. ввезен в США из Уругвая и широко использован в селекционной работе по выведению устойчивых к корончатой ржавчине сортов. К 1945 г. сорта этого происхождения составили до $^3/_4$ всех сортов овса, произрастающих в стране. С этого же, примерно, времени установлено, что они в сильной степени поражаются полосатостью листьев, вызываемой новым видом гриба *Helminthosporium victoria* Meeh. et Murphy [175].

Оказалось, что гриб обладает выраженной специфичностью: сорта овса другого происхождения были устойчивы к поражению [172].

Лаитзенберге [172] установил, что в растениях овса чувствительных сортов экстракт из мицелия *H. victoria* или из зараженного грибом растения в больших разведениях вызывает быстрое образование хлорозов, увядание, некрозы. Токсин снижает транспирацию как у чувствительных, так и у устойчивых сортов.

В опытах автора гриб выращивался на овсяном агаре на протяжении 10 дней; затем мицелий с одной чашки Петри снимали, измельчали и заливали 50 *мл* дистиллированной воды, в некоторых случаях подогревая паром в течение 5 *мин.* Испытание токсичности экстракта производилось путем обрызгивания раствором токсина листьев растений, выдерживанием отрезков стеблей, проращиванием семян в растворах токсина в стерильной и нестерильной почве или на агаре с токсином.

Установлено, что токсин диффундирует через эпидермис, проходит в ткань листа и сильно поражает ее, вызывая образование некрозов, увядание и засыхание листьев чувствительного сорта овса (Виктория) в больших разведениях. Симптомы поражения ткани под влиянием токсинов были аналогичны наблюдаемым при поражении растения самим грибом. При прорастании семян чувствительных сортов в растворах токсина отмечены (в зависимости от концентрации) потеря всхожести семян или сильное угнетение роста проростков, особенно корней.

Лак и Уиллер [174] отметили определенную связь между активностью токсинообразования и патогенностью культур *H. victoria.*

В их опытах гриб выращивался на среде следующего состава: 5 *г* $(NH_4)_2C_4H_4O_6$, 1 *г* KH_2PO_4; 0,5 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,13 *г* $CaCl_2$; 0,1 *г* NaCl; 30 *г* сахарозы в 1 *л.* Наиболее активное токсинообразование наблюдалось в стационарной культуре. Отмечены значительные колебания в активности в зависимости от объема среды. Так, при культивировании в 20 *мл* среды в колбах емкостью 125 *мл* культуральная жидкость содержала 500—5000 *ед* токсина на 1 *мл,* а при культивировании в 200 *мл* среды в колбах емкостью 2 *л* — 100 *ед/мл.*

Максимальное токсинообразование отмечено, начиная с девятидневного возраста культуры, оно связано с периодом наиболее активного роста мицелия *H. victoria* и сопровождается подкислением среды (до 2—3,5 pH). Подщелачивание культуральной жидкости с возрастом гриба сопровождается потерей токсичности. Токсин термостабилен. Условной единицей токсичности авторы считают содержание токсина в 1 *мл,* которое вызывает уменьшение длины корней до 50% по сравнению с

контролем. Семена чувствительного сорта овса после 24 *час* прорастания в дистиллированной воде на фильтровальной бумаге помещали на чашки с различным разведением токсина. В опытах с пятью сортами овса, генетически связанными с

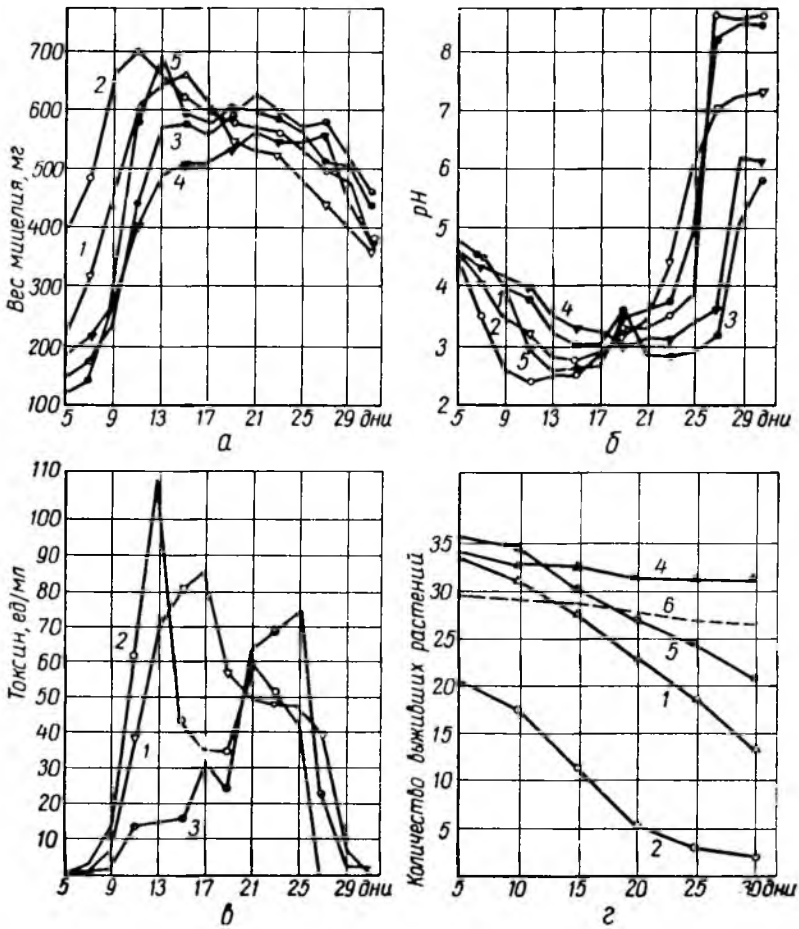


Рис. 48. Токсинообразование у патогенных и непатогенных вариантов *Helminthosporium victoria* (по Luke, Wheeler):

вес мицелия (*а*), изменение pH (*б*), выход токсина (*в*), патогенность для проростков овса (*г*). *1, 2, 3* — патогенные варианты; *4, 5* — непатогенные варианты; *6* — контроль.

сортом Виктория, отмечено уменьшение длины корней при разведении фильтрата 1 : 1 200 000, в то время как у четырех сортов, не связанных генетически с сортом Виктория и не чувствительных к токсину *H. victoria,* это наблюдалось только при разведении культуральной жидкости 1 : 6 и меньше. Ряд

растений — пшеница, рис, ячмень, рожь, кукуруза, томаты, горох, бобы, свекла и другие оказались устойчивыми к этому токсину.

Авторы наблюдали также обильный рост микроорганизмов на неразведенных фильтратах гриба, что дает основание считать его нетоксичным для последних. При изучении пяти вариантов из моноспоровых культур *H. victoria,* отличающихся патогенностью, установлено, что среди патогенных культур различие в степени патогенности связано с активностью токсинообразования (рис. 48).

При выращивании *H. victoria* на синтетической среде также отмечено активное токсинообразование: неочищенный фильтрат вызывал гибель сеянцев чувствительных сортов овса в разведении 1 : 1000, а снижение роста корней на 50% — в разведении 1 : 1 000 000.

Токсическое вещество, названное виктотоксин, было получено в частично очищенном виде. Оно нерастворимо в серном и петролейном эфирах, хлористом углероде.

Прайнгл и Браун [192—194] выделили токсины *H. victoria* в чистом виде и определили их химическую природу.

Активные штаммы гриба выращивали на среде приведенного выше состава с добавлением микроэлементов поверхностным методом при 25° С в течение 28 дней. Для очистки была использована культуральная жидкость в среднем задерживающая рост корней проростков овса в разведении 1 : 128 000. Первичное выделение и очистка проведены по схеме:

1) подкисление культуральной жидкости до pH 3,6 0,1-н. H_2SO_4; 2) упаривание ее под вакуумом ниже 45° С до 0,1 первоначального объема; 3) осаждение метанолом посторонних примесей из концентрата (равный объем метанола) и его последующее удаление; 4) экстракция токсина *n*-бутанолом (равным объемом); 5) концентрация бутанольного экстракта в вакууме, при температуре ниже —45° С, добавление *n*-метанола; 6) хроматография бутанол-метанольного экстракта на колонке окиси алюминия.

После промывания метанолом и 50%-ным водным этанолом проявлено две цветных полосы. Токсин элюирован 1%-ной водной уксусной кислотой. Уксуснокислый элюат концентрирован; раствор обладал способностью задерживать рост корней чувствительного сорта овса в концентрации около 0,02 *мкг/мл.*

Выход токсина достигал 100 *мг* со 100 *л* культуральной жидкости. Он не устойчив и быстро инактивируется при pH 4,0 и аэрации, в связи с чем отмечаются большие потери при выделении и очистке. Дальнейшая очистка проводилась адсорбцией на крахмале, целлюлозном порошке, ионофорезе на бумаге. Очищенное вещество изучено хроматографией на бумаге в нескольких растворителях; всюду получено одно пятно

(табл. 51). Очищенный токсин полностью задерживал рост корней проростков чувствительных сортов овса в концентрации 0,01 *мкг/мл*.

Таблица 51

Хроматография на бумаге виктотоксинина *H. victoria*

Система растворителей	Rf-пятна токсина
Бутанол : бензиловый спирт : вода (1 : 1 : 0 : 288) . .	0,0
Бутанол : уксусная кислота : вода (100 : 1 : 15) . . .	0,2
Пропанол : уксусная кислота : вода (200 : 3 : 100) . . .	0,7
Пропанол : фосфатный буфер pH 5,0 (2 : 1).	0,8
Метилэтилкетон : пропионовая кислота : вода (15 : 5 : 6)	0,6

Два компонента обнаружены авторами при хроматографии на бумаге (пропанол : уксусная кислота : вода — 200 : 3 : 100) раствора токсина, предварительно обработанного в течение 24 *час* насыщенным водным раствором двууглекислой соды. При проявлении нингидрином было два пятна: Rf 0,84, что соответствует виктотоксинину — трициклическому вторичному амину с двойной связью, и Rf 0,67, что соответствует пентапептиду, дающему при гидролизе аспарагиновую и глутаминовую кислоты, глицин, валин и один из лейцинов.

В дальнейшем авторы предложили видоизмененный метод получения виктотоксинина из культуральной жидкости [194]. Они предполагают, что специфичность токсина связана с пептидной частью токсина.

Бэрри и Фатрэлл [110] изучили токсичность проростков чувствительных и устойчивых сортов овса к фильтратам культур *H. victoria* из среды Чапека с различными источниками азота. По их данным, наиболее токсичными для проростков чувствительного сорта были фильтраты с азотнокислым аммонием, затем сернокислым аммонием, фенилаланином, триптофаном, метионином, тирозином, аспарагином. На проростки устойчивого сорта токсическое действие оказывали фильтраты со среды с метионином, фенилаланином и другими аминокислотами.

Шеффер и Прайнгл [205] изучили токсичность виктоксинина для семян и проростков различных злаков. В их опытах исходные фильтраты четырехнедельного возраста культуры *H. victoria* задерживали рост проростков овса в разведении до 1 : 2 000. Кристаллический солянокислый виктоксинин испытан в концентрации 50, 100, 200 *мкг/мл* для чувствительных и устойчивых сортов овса, яровой пшеницы, ячменя, сорго, риса. Наиболее чувствительным к токсину был овес, затем рис, ячмень (полное подавление роста сеянцев при концентрации

200 *мкг/мл*), затем пшеница и ячмень. При концентрации 100 *мкг/мл* отмечено подавление роста корней овса на 50%, а корни сеянцев других испытанных злаков не угнетались. К концентрации 50 *мкг/мл* корни проростков всех злаков были устойчивы.

Подавляющее действие на корни проростков овса зависит от pH среды: оно значительно усиливается при pH 7—8 и почти не отмечается при pH 4,0 (при половине минимальной концентрации — 38 *мкг*).

Виктоксинин более токсичен в неионизированной форме при высоком pH, чем в ионизированной при низком pH. По данным авторов, он значительно снижает поглощение кислорода тканями корней и вызывает потерю в их сухом весе.

Изучение влияния виктоксинина на активность дыхания митохондрий из проростков овса показало, что токсин угнетает их сукциноксидазу, сукциндегидрогеназу и кетоглютаровое окисление, но не оказывает действия на дегидрогеназу яблочной кислоты. Исходя из сравнительно низкой токсичности виктоксинина по сравнению с исходным токсином и различий в его действии на отдельные процессы метаболизма в растении, авторы не считают, что он имеет существенное значение в заболевании растений при поражении их *H. victoria.*

Кохлиоболин — токсин, образуемый *Helminthosporium oryzae,* возбудителем бурой пятнистости риса. Орсениго [185, 186] показал, что фильтраты гриба образуют токсины, угнетающие прорастание зерна и рост проростков риса. Автором изучено токсинообразование в зависимости от условий культивирования гриба. Хроматографически установлено в хлороформенных экстрактах два вещества, одно из которых обладает токсичностью. Токсин выделен в кристаллическом виде; температура плавления 180—182° С; слабо растворим в воде и полностью — в хлороформе и ацетоне. В больших разведениях токсичен для сеянцев риса.

Людвиг [173] изучил динамику токсинообразования разными штаммами *Helmintosporium sativum* — возбудителя заболевания ячменя. По данным автора, максимум токсинообразования в зависимости от условий культивирования наступает в разном возрасте культур. После максимума токсичность фильтратов резко снижается. Токсин *H. sativum* не обладал специфичностью.

Шеффер и Прайгнл [203] получили токсическое вещество из культуральной жидкости *Periconia circinata*, вызывающего заболевание некоторых злаков (сорго и др.). Токсин оказывал избирательное действие на чувствительные к поражению грибом растения.

Два наиболее вирулентных штамма выращивали на среде следующего состава: 30 *г* сахарозы, 5 *г* виннокислого аммония, 1 *г* NH_4NO_3, 1 *г* KH_2PO_4, 0,5 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 *г* NaCl,

0,13 *г* $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 *г/л* дрожжевого экстракта. Образование токсина происходило на 21—28-й день; культуральная жидкость приобретала грязно-коричневый цвет с желто-зеленой флюоресценцией; pH на 18—20-й день — 4,0 (pH исходное 5,4); на 28-й день pH — около 7,0. Токсичность определяли по степени задержки роста корней проростков чувствительного сорта в растворах с разным разведением токсина по сравнению с их ростом в контроле.

Разработан метод изоляции токсина путем хроматографии на ионнообменных адсорбентах. Вещество хорошо растворимо в воде, слабо в метаноле. Изучен ряд других свойств токсина. При хроматографировании в системе растворителей пропанол : уксусная кислота : вода (200 : 3 : 100) получено нингидрин — положительное пятно с Rf 0,57, соответствующее специфической токсичности.

Авторы считают, что выделенное ими из *Periconia circinata* вещество является полипептидным производным относительно низкого молекулярного веса. Токсин *P. circinata* более стабилен, чем токсин *H. victoria,* но значительно менее токсичен. Использование сложных сред (дрожжевого экстракта) для роста гриба в дальнейшем значительно затрудняет очистку токсина.

К о л л е т о т и н — токсин, по-видимому, полисахаридной природы, выделенный из *Colletotrichum fuscum,* вызывающего пятнистость листьев *Digitalis lanata, D. purpurea* [137, 138].

Гриб выращивали на видоизмененной среде Ричардса на качалке. Максимум образования токсина наблюдался на 17—18-й день культивирования, начало образования — 11-й день; pH изменяется к этому периоду с 4,5 до 6,8—7,0; среда пигментировалась в интенсивно желтый цвет.

Токсичность фильтратов испытывали по действию на верхушечные листья рассады томатов и листья наперстянки. Отмечен несколько отличный характер действия коллетотина на эти растения. На листьях томатов типичная пятнистость появлялась через 24 *час,* с более сильным поражением клеток палисадной ткани. При погружении черешков листьев наперстянки в раствор частично очищенного токсина в концентрации 2500 *мкг/мл* симптомы поражения появляются на третий день (увядание, обесцвечивание). Они сходны с наблюдаемыми при искусственном заражении растения *Colletotrichum fuscum. D. purpurea* более устойчива к действию коллектотина.

Токсин получен путем фракционированного осаждения ацетоном (2 : 1, 3 : 1). Высушенный исходный фильтрат проявлял токсическое действие в концентрации 200 *мг/мл,* а концентрированный ацетоном осадок — 30—60 *мг/мл.* Токсин нерастворим в органических растворителях; инактивировался в кислоте и щелочи; термостабилен. Разделение хроматографическим путем или адсорбцией на ионнообменных смолах не было успеш-

ным. Хроматографирование кислотного гидролизата вещества показало наличие в нем глюкозы, галактозы, маннозы, аминокислот, но как при сильном, так и слабом кислотном гидролизе токсин инактивировался.

Раствор токсина давал положительную реакцию на полисахариды. Путем диализа было установлено, что токсин содержит полисахаридную и полипептидную фракции.

Оку и Наканиши [184а] изолировали токсин из гриба *Ascochyta fabae* S p e a g, вызывающего пятнистость листьев бобов.

Гриб выращивали в погруженной культуре на среде следующего состава (на 1 *л* : 20 *г* глюкозы 2,5 *г* пептона, 2 *г* K_2HPO_4, 1 *г* KCl, 0,1 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 *г* $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 6 *мг* тиамин-мононитрата, 2 *мг* пиродоксина солянокислого, 2 *мг* рибофлавина, 3 *мг* кальций-пантотената.

Первичная изоляция токсина производилась экстракцией хлороформом из подкисленной до pH 3,0 культуральной жидкости. После удаления хлороформа под вакуумом коричневый осадок был подвергнут обработке горячим *n*-гексаном, после удаления которого кристаллы токсина получены из горячего этанола. При перекристаллизации из бензола и ацетона получались нежные светло-желтые кристаллы, хорошо растворимые в хлороформе, средне — в этаноле, этиленгликоле, бензоле, ацетоне, этилацетане, слабо — в воде. Образование токсина в культуральной жидкости повышалось с трех- до 10-дневного возраста культуры при pH 7,0—8,0. На сахарозе, ксилозе, лактозе, растворимом крахмале образовывалось меньше токсина, не отмечено образования токсина на средах с глицерином, уксуснокислом натре. Выход токсина на девятый день роста культуры составлял 76 *мг/л* в неочищенных кристаллах.

Изучены некоторые физико-химические свойства токсина: в органических растворителях он проявляет сильно выраженную зеленую флюоресценцию в УФ свете; спиртовый раствор обесцвечивается при добавлении капли NaOH. Спиртовый раствор токсина имеет три адсорбционных максимума в УФ-220, 286, 415 *ммк* ($\varepsilon = 20, 617; 17, 550; 5, 700$); получен характерный спектр в инфракрасном свете на плотных пластинках KBr (рис. 49). Разрушается при 200—201° С. Молекулярная формула — $C_{15}H_{16}O_5$.

Токсин вызывал образование некрозов на листьях двухнедельных проростков, задерживал прорастание семян разных растений (табл. 52), а также проявлял незначительную антибиотическую активность. Авторы предполагают, что действие токсина в растительном организме может быть связано с торможением синтеза металлсодержащих ферментов.

Токсичность культуральной жидкости *Phytophthora infestans* установлена путем инфильтрации ее в дольки картофельных листьев [198].

Гриб культивировался на минерально-сахарозной (10 *г/л*) среде с отфильтрованным соком гороха. Через три-четыре дня после инфильтрации культуральной жидкости гриба трех-четырехнедельного возраста на дольках листьев картофеля отмечены некротические пятна, слабый хлороз, увядание.

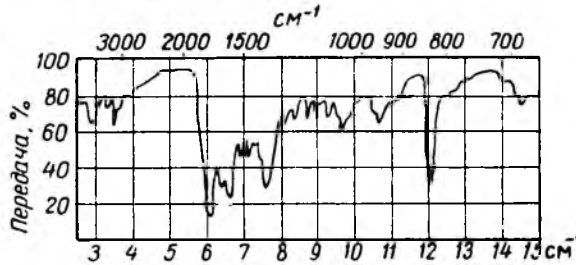


Рис. 49. Инфракрасный спектр токсина *Ascochyta fabae* (по Oku, Nakanishi).

Влияние различных источников углерода — сахаров и органических кислот — на рост и токсинообразование *Ph. infestans* испытано Шейдель [206]. Токсичность фильтратов определяли по

Таблица 52

Действие токсина *Ascochyta fabae* на прорастание семян некоторых высших растений

Концентрация токсина, *мкг/мл*	Коэффициент токсичности (отношение длины колеоптиля к длине корней)					
	Рапс		Просо		Вика	
	колеоптиль	корни	колеоптиль	корни	колеоптиль	корни
200			32	6	18	6
100	45	10	50	5	85	50
50	97	81	71	26	142	69
25	95	126	93	79	102	88
12.5	85	106	122	119	106	139
Контроль	100	100	100	100	100	100

реакции на листьях картофеля. В зависимости от условий культивирования максимальная токсичность фильтратов отмечалась в трех—шестинедельном возрасте культуры гриба. Так, при культивировании на среде Фриз (20 *г* глюкозы, 5 *г* винно-кислого аммония, 1 *г* NH_4NO_3, 1 *г* KH_2PO_4, 0,5 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 *г* NaCl, 0,1 *г* $CaCl_2$, 10 капель 1%-ного $FeCl_3$, 50 аневрина на 1 *л*) наибольшая токсичность фильтратов отмечалась в трех — пятинедельном возрасте.

Наиболее пригодными для роста гриба были сахароза, глюкоза, янтарная, яблочная, молочная, лимонная и винная кислоты.

Токсин, осажденный из культуральной жидкости этанолом, оказывает на листья картофеля токсическое действие, аналогичное действию культуральной жидкости.

Шервуд и Линдберг [207] при культивировании штамма *Rhizoctonia solani,* патогенного для семян и проростков люцерны, садового горошка и хлопчатника, получили токсин, подавляющий прорастание семян этих растений.

Гриб культивировался на твердой среде из смеси песка, кукурузной муки и воды. Стерильная и нестерильная водная вытяжка из этой среды в возрасте двух—пяти недель обладала фитотоксическими свойствами. Путем фракционированного осаждения ацетоном, диэтиловым эфиром и хроматографированием на бумаге получено высоко токсическое для семян индивидуальное вещество (Rf 0,4—0,5—0,62).

Ряд специфических реакций, по данным авторов, показывает, что молекула фитотоксина обладает свойствами фенолов и гликозидов.

Мироха, Уильсон, Дэвэу [176а] изучали роль фумаровой кислоты в заболевании миндаля гнилью скорлупы, вызываемой *Rhizopus stoloniferum, Rh. circinatus, Rh. arrhisus.* При инокулировании мицелия гриба, меченного по C^{14}, в плодах деревьев наблюдались симптомы, идентичные появляющимся при естественной инфекции их. Фумаровая кислота в концентрации, обычно наблюдаемой в пораженных тканях, вызывала симптомы заболевания. Концентрация ее в листьях больных и здоровых растений не велика и почти одинакова, но в скорлупе больных растений значительно больше чем здоровых — соответственно 0,2 и 0,07 *мг/г.* Авторы считают, что фумаровая кислота или ее производные, образуемые грибом, являются причиной гнили.

Мирчинк и др. [47—49] изучили образование токсических веществ *Pen. cyclopium* и некоторых других видов почвенных грибов и их влияние на содержание азота и аминокислот в растении.

Хенни, Барбье, Ледеге [156а] из культур *Asp. flavus, Asp. oryzae* изолировали два фитотоксические вещества — аспергилломаразмин А и Б; первое идентично ликомаразминовой кислоте, а второе отличается от него тем, что вместо диамино-2—3-пропионовой кислоты (обнаруживаемой при кислотном гидролизе) в нем содержится гликокол.

Фитотоксические свойства многих видов почвенных микромицетов установлены Пидопличко с сотрудниками [189а]. Имеются указания также о фитотоксичности антибиотиков из микромицетов — патулина, виридина, глиотоксина и других.

Приведенные данные показывают, что многие виды фитопатогенных грибов как при культивировании, так нередко и при поражении растений, образуют токсины, относящиеся к различным по химической природе соединениям и играющие определенную роль в патогенезе вызываемых ими заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксенова В. О токсичности полисахаридной фракции токсина *Botrytis cinerea*.— .— ДАН СССР, 1962, **147**, 496.

2. Аскалонов С. Патогенность грибка *Stachybotrys alternans* для рогатого скота и лабораторных животных.— В кн.: Новое грибковое заболевание лошадей (стахиботриотоксикоз). Изд-во АН УССР. К., 1949, 7.

3. Ахвледиани К., Выделение токсина гриба *Phoma tracheiphila*— возбудителя болезни лимонов «мальсеко».— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

4. Бакай С. Гриб *Stachybotrys alternans*, его биология и полевая экология.— Науч. тр. Укр. ин-та экспер. вет. 1944, 12, 121.

4а. Бакай С. Микологические исследования при лабораторной диагностике стахиботриотоксикоза — Тез. докл. Совещ. по микотоксикозам. Киев, 26.X—1.XI 1956 г., 1956.

5. Барт В. Изучение токсичности злаков позднего сбора в Латвийской ССР.— Докл. Ссовещ. по микотоксикозам людей и с.-х. животных. К., 1956.

5а. Башмакова Е. Клиника и патологоанатомическая картина у поросят при экспериментальном фуразиотоксикозе.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам человека и с.-х. животных. К., 1961.

6. Билай В. Виды *Fusarium* на зерне хлебных злаков и их токсические свойства.— Микробиология, 1947, **16**, 19.

6а. Билай В. Действие экстрактов токсических грибов на животные и растительные ткани.— Микробиология, 1948, **17**.

7. Білай В. Азотисте живлення грибів з роду *Fusarium*. 1. Джерела азотного живлення.— Мікробіол. ж., 1949, **9**, 19.

8. Билай В. Ядовитые грибы на зерне хлебных злаков. Биология и систематика секции Sporotrichiella рода *Fusarium*. Изд-во АН УССР, К., 1953.

8а. Билай В. Фузарии. Биология и систематика. Изд-во АН УССР, К., 1954.

9. Билай В. О специфичности токсинов и антибиотиков у грибов.— Тез. докл. на совещ. по микотоксикозам человека и с.-х. животных. К., 1956.

10. Билай В., Пидопличко Н. Некоторые данные о глубинном способе культивирования токсических грибов и выделении токсических веществ.— Тез. докл. совещ. по микотоксикозам людей и с.-х. животных. К., 1956.

11. Білай В., Підоплічко М. Первісна ізоляція токсичних речовин *Dendrodochium toxicum, Fus. sporotrichiella* при глубинному методі культивування.— ДАН УРСР, 1958, 11, 1255.

12. Билай В. Антибиотические свойства дендродохина.— Микробиология. 1961, **30**, 1023.

12а. Билай В., Михайловлина Н., Степанов Ф. Действующее начало дендродохина.— ДАН СССР, 1962, **144**, 105.

13. Борисевич В., Клінічні спостереження над кіньми в експерименті по вивченню дендродохіотоксикозу.— У кн.: Нове кормове отруєння коней (дендродохіотоксикоз). Вид-во АН УРСР, К., 1947.

14. Борисевич В. Морфологические и биохимические изменения в крови у крупного рогатого скота при экспериментальном стахиботриотоксико-

зе.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам человека и с.-х. животных. К., 1961

15. Гелованн Д. Токсикологическая характеристика склероциев гриба *Claviceps paspali*.— Тез. докл. совещ. по микотоксикозам человека и с.-х. животных. К., 1956.

16. Гецова Г. Материалы к экспериментальному изучению фузариозного токсикоза.— В кн.: Микотоксикозы человека и с.-х. животных. Под ред. В. Билай. Изд-во АН УССР, К., 1960.

17. Гецова Г. Микрофлора кишечника у мышей при экспериментальном фузариотоксикозе.— Докл. совещ. по микотоксикозам человека и с.-х. животных. К. 1961.

18. Гойманн Э. Инфекционные болезни растений. ИЛ, М., 1954.

19. Горленко М. Токсины у плесневых грибов.— ДАН СССР, 1946, **54**, 453.

20. Губарев Е., Губарева Н. Химическая природа и некоторые химические свойства ядов, обусловливающих септическую ангину.— Биохимия. 1945, **10**, 199.

21. Гвоздов А. К микрофлоре кормов, вызывающих стахиботриотоксикоз у крупного рогатого скота.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам человека и с.-х. животных. К., 1961.

22. Джилавян Х. Аспергиллотоксикоз свиней.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам человека и с.-х. животных. К., 1961.

23. Дроботько В. и др. Этиология стахиботриотоксикоза.— В кн.: Новое заболевание лошадей и людей (стахиботриотоксикоз). Изд-во АН УССР, К., 1949, 7.

24. Ефремов В. Алиментарно-токсическая алейкия. Медгиз, М., 1948.

25. Измайлов И. Микотоксикоз крупного рогатого скота.— Тр. Моск. вет. акад., 1960, **31**, 82.

26. Измайлов И. Этиология и патогенез стахиботриотоксикоза крупного рогатого скота.— Ветеринария, 1962, **4**, 27.

27. Измайлов И., Гауке А., Корт Б. Маркировка *Stachybotrys alternans* изотопом серы (S^{35}).— Вісн. с.-г. науки, 1963, 10, 107.

28. Измайлов И. Стахиботриотоксикоз крупного рогатого скота в западных областях УССР. Авторефер. докт. дисс. Харьков, 1964.

29. Иоффе А. Токсичность грибов на перезимовавших злаках. Автореф. канд. дисс. Чкалов, 1950.

30. Карпова-Бенуа Е. О токсических грибах на волокне хлопка.— Бот. ж. 1954, **39**, 488.

31. Квашнина Е. Первичная люминесценция грибов из рода *Fusarium*.— Бюлл. научн.-техн. информ. Всесоюз. ин-та вет. сан., 1958, 3, 50.

32. Квашнина Е., Грибы из рода *Fusarium*, вызывающие кормовые отравления сельскохозяйственных животных.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. Изд-во АН УССР, К., 1961.

32а. Кикути М., Нахара М. Последовательность пигментообразования в мицелии дефективных штаммов *Penicillium islandicum*, полученных в результате УФ облучения.— РБЖ, 1963, 9Б208.

33. Королева В. О роли *Aspergillus fumigatus* в новом кормовом токсикозе свиней (аспергиллотоксикозе).— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.

34. Кудинова Г. Некоторые вопросы физиологии грибов рода *Fusarium* секции Sporotrichiella.—Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.

35. Красильников Н. Микроорганизмы почвы и высшие растения. Изд-во АН СССР, М., 1958.

36. Кретович В. и др. Биохимические особенности ядовитого зерна.— Биохимия, 1945, **10**, 279.

37. Кретович В., Бундель А. Исследование масла из перезимовавшего в поле токсического зерна.— Биохимия, 1945, **10**, 3.

37а. Кулик Я. Вивчення властивостей ліпідів гороху, ураженого грибом *Asp. flavus*.— Мікробіол. ж. 1957, **19**, 3.

38. Курасова В. Методы окраски грибов в органах и тканях животных.— Тез докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.

39. Курманов И. Стахиботриотоксикоз крупного рогатого скота.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам, К., 1961.

40. Линник Ф. Материалы по изучению стахиботриотоксикоза у людей.— В кн.: Новое грибковое заболевание лошадей и людей (стахиботриотоксикоз). Изд-во АН УССР, К., 1949, 27.

41. Лясс Л. Экспериментальные исследования по микотерапии лейкозов. Автореф. канд. дисс. М., 1950.

42. Малашенко Ю. До питання про первісну ізоляцію дендродохіну.— ДАН УРСР, 1961, 3, 379.

42а. Малашенко Ю. Экспериментальный дендродохиотоксикоз у лабораторных животных.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.

43. Малашенко Ю. Влияние дендродохина, токсина микроскопического гриба *Dendrodochium toxicum* на некоторые стороны обмена у экспериментальных животных.—Тез. докл. на I Всесоюз. съезде биохимиков. Л., 1964.

44. Махмудова Р. Исследование методов определения токсичности культур *Fusarium* из секции Sporotrichiella.— Тр. Всесоюз. н.-и. ин-та зерна, 1963, 46, 69.

45. Мешков Н., Гевкан И., Збронец Е. Патоморфология нового грибного заболевания крупного рогатого скота.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.

46. Микотоксикозы человека и сельскохозяйственных животных. Под ред. В. И. Билай. Изд-во АН УССР, К., 1954.

47. Мирчик Т. О грибах, обуславливающих токсичность дерново-подзолистой почвы различной степени окультуренности.— Микробиология, 1957, 26, 78.

48. Мирчик Т., Грешных К. Токсичность грибов рода *Penicillium* по отношению к растениям и животным.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.

49. Мирчик Т., Коныесская Ф., Грешных К. Влияние токсинов почвенных грибов на содержание азота и аминокислот в растении.— Микробиология, 1962, 31, 669.

50. Миронов С., Мясников В. К характеристике ядов из перезимовавших злаков.— Тр. Чкалов. ин-та эпид. 1947, 61.

51. Мишустин Е., Трисвятский Л. Микробиология зерна и муки. Хлебиздат, М., 1960.

52. Михайловлина Н., Середюк Л., Харченко С. Ізоляція деяких метаболітів з міцелію *Dendrodochium toxicum*.— Мікробіол. ж., 1964, 24, 3.

53. Морошкин Б., Измайлов И., Костина А. Клиническая картина микотоксикоза крупного рогатого скота.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.

54. Нагорный И. Клинические признаки и течение стахиботриотоксикоза у крупного рогатого скота.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.

55. Налбалдян А. Инактивация токсина, образуемого грибом *Fusarium culmorum*, почвенными и эпифитными бактериями.— Бюлл. науч.-техн. информ. по с.-х. микробиол., 1960, 7 (1), 22.

56. Нестеров Т. Материалы к изучению токсичности плесневых грибов на мясных продуктах.— В кн.: Микотоксикозы человека и с.-х. животных. Под ред. В. И. Билай. Изд-во АН УССР, К., 1960.

57. Новаковская Е. Изменение азотистых соединений в питательной среде, белков ржи и пшеницы под влиянием некоторых штаммов гриба *Fusarium sporotrichiella*.— Тез. докл. совещ. по микотоксикозам, К., 1956.

58. Олифсон Л. Химическая деятельность некоторых видов грибов, поражающих зерно хлебных злаков.— В кн.: «Микотоксикозы человека и с.-х. животных». Под ред. В. И. Билай. Изд-во АН УССР, К., 1960, 47.

59. Олифсон Л., Перепелицина П. О распределении яда, вырабатываемого грибами *Fusarium sporotrichiella* в организме животных при отравлении.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.

59а. Очкина И. Об устойчивости спор *Dendrodochium toxicum*.— Тр. Всесоюз. н.-и. ин-та вет. санит., 1960, **16**, 383.

60. Патурова Г., Гусарев А. О токсичности гриба *Aspergillus clavatus*.— Изв. Ростов. н/Д н-и ин-та эпидемиол., микробиол. и гигиены, 1963, **24**, 75.

61. Пашевич В. Химическая природа яда, образуемого грибком *Stachybotrys alternans*. Автореф. канд. дисс. Вильнюс, 1950.

62. Перкель Н. Изучение токсичности забайкальских штаммов *Fusarium sporotrichiella* в связи с этиологией уровской (Кашина—Бека) болезни.— Тез. докл. совещ. по микотоксикозам. К., 1956.

62а. Підоплічко М. До систематики роду *Stachybotrys* Corda.— Мікробіол. ж., 1946, 8, 2.

63. Підоплічко М., Білай В. Токсичні гриби на зерні хлібних злаків. Вид-во АН УРСР. К., 1946.

63а. Пидопличко Н., Билай В. Новый токсический гриб *Dendrodochium toxicum* Pidopl. et Bil.— ДАН СССР, 1947, **56**, 759.

63б. Підоплічко М., Білай В. Шляхи вивчення невідомого захворювання коней і виявлення його збудника.— У кн.: Кормове отруєння коней (дендродохіотоксикоз). Вид-во АН УРСР, К., 1947, 7.

64. Пидопличко Н. Некоторые данные о *Stachybotrys alternans*.— В кн.: Новое грибковое заболевание лошадей и людей (стахиботриотоксикоз). Изд-во АН УССР, К., 1949, 111.

64а. Підоплічко М. Про деякі актуальні питання мікотоксикології.— Мікробіол. ж., 1960, **22**, 8.

65. Пидопличко Н. Микрофлора грубых кормов. Изд-во АН УССР, К., 1953.

66. Пидопличко Н., Билай В. Токсические грибы на продовольственных продуктах и кормовых средах и задачи их изучения.— Тез. докл. совещ. по микотоксикозам. К., 1956.

67. Пидопличко Н., Билай В. Токсические грибы, развивающиеся на продовольственных продуктах и кормах.— В кн.: Микотоксикозы человека и с.-х. животных. К., 1960, 5.

68. Пидопличко Н., Билай В. Современное состояние и задачи изучения грибов — возбудителей алиментарных микотоксикозов.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.

68а. Петровський Г., Платонова-Петровська А. До токсикології гриба *Dendrodochium toxicum* Pidopl. et Bil.— У кн.: Кормове отруєння коней (дендродохіотоксикоз). Вид-во АН УРСР, К., 1947, 65.

69. Пономаренко Ф. Патологічна анатомія дендродохіотоксикозу коней.— У кн.: Кормове отруєння коней (дендродохіотоксикоз). Вид-во АН УРСР, К., 1947, 70.

70. Пономаренко Ф., Скирта О., Малашенко Ю. Досвід патоморфологічного аналізу токсичної дії дендродохіну на організм кролів та щурів.— Мікробіол. ж., 1961, **23**, 15.

71. Прокопович Н. К вопросу о фармакологическом действии веществ, полученных из гриба *Stachybotrys alternans*.— В кн.: Новое грибковое заболевание лошадей (стахиботриотоксикоз), Изд-во АН УССР, К., 1949, 106.

71а. Рубинштейн О., Лясс А. Об этиологии алиментарно-токсической алейкии.— Гигиена и санитария, 1948, 7, 33.

72. Рубинштейн Ю. Влияние условий культивирования на токсинообразование *Fusarium sporotrichiella*.— В кн.: Микотоксикозы человека и с.-х. животных. Под ред. В. Билай. Изд-во АН УССР, К., 1960, 53.

73. Рубинштейн Ю. Микотоксикозы людей и задачи их дальнейшего изучения.— Тез. докл. совещ. по микотоксикозам, К., 1956.

74. Рубинштейн Ю. Биохимические свойства культур фузарнум.— Микробиология, 1950, **19**, 5.
75. Рубинштейн Ю. Актуальные вопросы в изучении фузариотоксикозов.— Вопр. питания, 1956, 15, 8.
76. Рубинштейн Ю. Пищевые фузариотоксикозы.— В кн.: Микотоксикозы человека и с.-х. животных. Под ред. В. И. Билай. Изд-во АН УССР, К., 1960, 71.
77. Рубинштейн Ю., Кукель Ю., Кудинова Г. Новый экспериментальный хониотоксикоз, вызванный *Fusarium sporotrichiella*.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.
78. Савельева О., Рубин Б. К биохимии гриба *Phytophthora infestans*.— ДАН СССР, 1961, **137**, 980.
79. Савельева О. Химическая природа и физиологическая активность токсина *Phytophthora infestans*.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохимиков. Л., 1964.
79а. Савельева О., Васюкова Н. Состав и токсические свойства антигена, выделенного из мицелия гриба *Phytophthora infestans*.— В кн.: Тезисы докл. IX съезда Менделеевского химич. об-ва, 1965, Киев.
80. Самсонов П. Респираторные микотоксикозы (пневмономикотоксикозы).— В кн.: Микотоксикозы человека и с.-х. животных. Под ред. В. И. Билай. Изд-во АН УССР, К., 1960, 107.
81. Самсонов А., Самсонов П. Респираторные микотоксикозы (пневмономикотоксикозы) в эксперименте.— В кн.: Микотоксикозы человека и с.-х. животных. Под ред. В. И. Билай. Изд-во АН УССР, К., 1960, 115.
82. Самсонов А. Патогистологические изменения внутренних органов при экспериментальных респираторных микотоксикозах.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.
83. Саркисов А., Квашнина Е. Токсикобиологические свойства фузариум споротрихиоидес.— В кн.: Перезимовавшие под снегом зерновые культуры. (М-во с.-х.). М., 1948.
84. Саркисов А. Микотоксикозы, Сельхозгиз, М., 1954.
85. Саркисов А. Основные итоги и дальнейшие задачи изучения микотоксикозов сельскохозяйственных животных.— Тез. докл. совещ. по микотоксикозам. К., 1956.
86. Саркисов А. Общая характеристика алиментарных микотоксикозов сельскохозяйственных животных.— В кн.: Микотоксикозы человека и с.-х. животных. Под ред. В. И. Билай. Изд-во АН УССР, К., 1960, 124.
87. Саркисов А. и др. Фузариозотоксикоз крупного и мелкого рогатого скота.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам, К., 1961.
87а. Свойская Б. Опыты изолирования ядовитых веществ из перезимовавшего проса.— Тр. Чкалов. ин-та эпидемиол., 1947, 11, 45.
88. Серебрянная С. О действии токсина *Stachybotrys* на изолированное сердце лягушки и сосуды уха кролика.— В кн.: Новое грибковое заболевание лошадей (стахиботриотоксикоз). Изд-во АН УССР, 1949, 110.
89. Соколова В. Роль некоторых фенольных соединений в явлениях иммунитета.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохимиков. Л., 1964.
90. Сопрунов Ф., Галиулина З. Хищные грибы-гифомицеты из почвы Туркменистана.— Микробиология, 1951, **20**, 489.
91. Спесивцева Н. Микозы и микотоксикозы животных. Сельхозгиз, М., 1964.
92. Спесивцева Н. Микотоксикозы сельскохозяйственных животных и задачи их изучения.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.
93. Ткаченко А., Громыко А. Изыскание аллергических методов диагностики стахиботриотоксикоза лошадей.— Тез. докл. совещ. по микотоксикозам. К., 1956.
94. Ткаченко А. Сравнительные данные о заболеваниях стахиботриотоксикозом зубробизона и бегемота (в условиях зоопарка).— В кн.: Микотоксикозы человека и с.-х. животных. Под ред. В. И. Билай. Изд-во АН УССР. К., 1960.

95. Тостановська А., Ратманська Ю. До питання про токсичність зерна, зараженого деякими грибами з роду *Fusarium*.— Мікробіол. ж., 1951, **13**, 1.

96. Тостановская А. Токсикологическая характеристика зерна, зараженного *Fusarium sporotrichiella* и другими видами грибов, выделенными из хлебных злаков в УССР.— Тез. докл. совещ. по микотоксикозам. К., 1956.

97. Федотова Т., Биохимия на службе защиты растений.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохимиков. Л., 1964.

98. Фиалков Я., Серебряный С. Выделение токсических веществ из культуры грибов *Stachybotrys alternans* и исследование их химической природы.— В кн.: Новое грибковое заболевание лошадей и людей. Изд-во АН УССР, К., 1949.

99. Цатурова Г. Профессиональные аспергиллезы солодовщиков и характеристика выделенных культур аспергиллов.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам. К., 1961.

100. Шулюмова А., Кузьмин А., Федько П. Эпизоотологические данные по стахиботриотоксикозу лошадей в Одесской обл.— Тез. докл. совещ. по микотоксикозам. К., 1956.

101. Шулюмова Е. и др. Изучение культуральных и токсических свойств штаммов грибов *Stachybotrys alternans*, выделенных на юге Украины.— Тез. докл. совещ. по микотоксикозам. К., 1956.

102. Элпидина О. Антибиотические и антибластические свойства поина.— Антибиотики, 1959, 4, 46.

103. Элпидина О. Токсические и антибиотические свойства поина.— В кн.: Микотоксикозы человека и с.-х. животных. Под ред. В. И. Билай. Изд-во АН УССР, К., 1960, 59.

104. Элпидина О. Влияние поина, токсина *Fusarium sporotrichiella* v. *poae* на рост злокачественных опухолей по данным эксперимента.— Тез. докл. II совещ. по микотоксикозам, К., 1961.

105. Харченко С., Михайловлина Н., Акоренко С. До питання біосинтезу дендродохіну.— Мікробіол. ж., 1964, **26**, 37.

106. Шевчик В. Применение некоторых методов при исследовании новых антибиотиков.— Микробиология, 1959, **28**, 1.

107. Abe M. et al. Researches on ergot fungus. Isolation of a mutant productive of agroclavine rather excellently even in submerged culture.— J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1953, 27, 18; 24.

108. Aberdeen J., Jones W. A Hallucinogenic toadstool.— Austral. J. Sci., 1958, **21**, 149.

108a. Albright J. Moldy corn toxicosis in cattle.— J. Amer. Vet. Med. Assoc., 1964, 5.

109. Bampton S. Toxins and fungi.— Times Sci. Rev., 1962, **45**, 9.

109a. Bampton S. Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in ground nuts. Pt. 1.— Trop. Sci., 1963, **5**, 74.

110. Berry R., Futrell M. Toxin production by *Helminthosporium victoriae* on synthetic media containing different nitrogen sources. Phytopathology, 1961, **51**, 177.

111. Blattny. K otazee jedovatosti eiruvky odlisne — Tricholoma sejenctum (Sol. ex Ft) Gueb.— Ceska Mycol., 1953, **13**, 125.

112. Bossi R. Uber die Wirkung der Fusarinsäure auf die Polyphenoloxydase.— Phytopathol. Zs., 1960, **37**, 2273.

113. Brady L., Tyler V. The biosynthesis of clavine alkaloids.— Planta med., 1959, **7**, 225.

114. Braun A., Pringle R. Pathogen factors in the physiology of disease. Toxins and other metabolites.— In: Plant pathol. problems and progress, 1908—1958. Ed. C. Holton Univ. Wiscons. Press, Madison, 1959, 88.

115. Braun R. Wirkungsweise und Umwandlungen der Fusariensäure.— Phytopathol. Zs., 1960, **39**, 197.

116. Brian P. et al. Phytotoxic compounds produced by Fusarium equiseti.— J. Exper. Bot., 1961, 12, 1.

117. Buxton E. Problems of plant wilt diseases.— Agric. Rev., 1957, 3, 28.

118. Carll W. Toxicity of *Aspergillus fumigatus* substrates to animals.— Vet. Med., 1955, 50, 5, 210.

119. Chaze S., Thieblot L., Lagard I. Sur la Toxicité de cultures temulentum L.— C. r. Acad. sci, Paris, 1953, 37, 1572.

119a. Chauchan S. Toxin production by *Fusarium orthoceras* v. *ciceri* causing wilt of gram.— Proc. Nat. Acad. Sci. India, 1961, *B*31, 341.

120. Clanson K., Plattner P., Gäumann F. Über ein Welkeerzeugengendes Stoffwechselprodukt von *Fusarium lycopersici* Sacc.— Zs. Schweiz. Bot. Ges., 1944, 54, 523.

121. Curtis R. Root curvatures induced by culture filtrates of *Aspergillus niger*.— Science, 1958, 128, 3325, 661.

122. Denfel I. Mutterkornzüchtung auf tetraploiden Roggen.— Arch. Pharmakol. Ber., 1954, 287, 329.

123. Diena B., Tanner C. Purification studies on the toxin-inactivating substance «nixiversin».— Canad. J. Microbiol., 1963, 6, 843.

124. Dimond A., Waggoner P. Effect of lycomarasmin decomposition upon estimates of its production.— Phytopathology, 1953, 43, 319.

125. Dimond A., Waggoner P. The physiology of lycomarasmin production by *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*.— Phytopathology, 1953, 43, 195.

126. Dimond A. Pathogenes in the wilt diseases.— Ann. Rev. Plant. Physiol. Stanford, Calif., 1957, 6, 329.

127. Dimond A. Some biochemical aspects of disease in plants.— Progr. Chem. Org. Nat. Products, 1959, 17, 298.

128. Deuel H. Über Störungen des Spurenelementaushaltes der Pflanzen durch Welketoxine.— Phytopathol. Zs, 1954, 21, 337.

129. McDonald D., Harkness C. Growth of *Aspergillus flavus* and production of alfatoxin in groundnuts. Pt II.— Trop. Sci., 1963, 5, 149.

130. McDonald I., Cheldelin V., Ring T. Glucose catabolism in the ergot fungus *Claviceps purpurea*.— J. Bacteriol., 1960, 80, 61.

131. Felklova M. Prispevek k pestovani *Claviceps purpurea* Tul. na umelych pudach.— Ceska mykol., 1958, 12, 232.

132. Fukui M., Vasuda J. Serological studies on *Aspergillus fumigatus*.— Mycopathol. et mycol. appl., 1961, 14, 39.

133. Gambogi P. Le tossine dei parassiti dei vegetali.— Agric. Ital., 1959, 59, 287.

134. Garay A. Substances spéciales jouant un rôle dans l'infection des plantes, particulièrement en ce qui concerne l'ergot du seigle (*Claviceps purpurea*).— Acta. biol. Acad. sci. Hung., 1957, 7, 325.

135. Gayed S., Naguib K. The effect of pH value on the toxicity of culture filtrates of *Helminthosporium savitum* and on its possible correlation to extracellular nitrogen accumulation.— Mycopathol. et mycol. appl., 1962, 16, 83.

136. Gjerstad G. Intermediary metabolism of ergot. I. Amino acid metabolism.— J. Amer. Pharmac. Assoc. Scient., 1959, 48, 443.

137. Goodman R. Observations on the production, physiological activity and chemical nature of toxin from *Colletotrichum fuscum* Laub.— Phytopathol. Zs., 1959, 37, 187.

138. Goodman R. Colletotin, a toxin produced by *Colletotrichum fuscum*.— Phytopathol., 1960, 50, 325.

139. Gäumann E., Naef-Roth S., Miescher G. Untersuchungen über das Lycomarasmin.— Phytopathol. Zs., 1950, 16, 257.

140. Gäumann E. Some problems of pathological wilting in plants.— Edv. in Enzymology, 1956, 11, 401.

140a. Gäumann E., Naef-Roth S. Über den jahreszeitlichen Gang der Welketoxin Empfindlichkeit der Somatenpflanzen.— Phytopathol. Zs., 1953, 20, 449.

140b.— Gäumann E. Toxins and plants diseases.— Endeavour, 1954, **13**, 198.

141. Gäumann E., Naef-Roth S. Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. III. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Absättigung mit Eisenionen.— Phytopathol. Zs., **24**, 373.

142. Gäumann E., Naef-Roth S. Die Verschieebungen der Toxizität durch steigende Absätting mit verschiedenen Schwermetallionen.— Phytopathol. Zs., 1956, **25**, 418.

143. Gäumann E. Über die Einfluβ der eisener nahrung auf die Lycomarasmin-Empfindlichkeit der Tomatenpflanzen.— Phytopathol. Zs., 1957, **30**, 87.

144. Gäumann E., Lefler. Über die Wirkung von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität der Markzellen von Tomatenpflanzen.— Phytopathol. Zs., 1957, **28**, 319.

145. Gäumann E. Über Fusarinsäure als Welketoxin.— Phytopathol. Zs., 1957, **29**, 1.

146. Gäumann E. Fusaric acid as a wilt toxin, Phytopathology, 1957, 47, 342.

147. Gäumann E. Über die Wirkungsmechanismen der Fusarinsäure.— Phytopathol. Zs., 1958, **32**, 359.

148. Gäumann E. et al. Der Einfluβ der Fusariensäure auf den Wasserhaushalt abgeschnittener Tomatesprosse.— Phytopathol. Zs., 1958, **32**, 225.

149. Gäumann E. The mechanisms of fusaric acid injury.— Phytopathology. 1958, **48**, 670.

150. Gäumann E. Rauschzustände nach Pilzgenus.— Experientia, 1959, 504.

151. Gäumann E., Naef-Roth S. Über Lycomarasminsäure, ein Umwandlungsprodukt des Lycomarasmins.— Phytopathol. Zs., 1959, **34**, 426.

152. Gäumann E., Naef-Roth S., Kern H. Zur phytotoxischen Wirksamkeit der Enniatine.— Phytopathol. Zs., 1960, **40**, 45.

153. Graniti A. Alkune ricerche intorno alla attivita fitotossica dei liquidi colturali di *Deutoroptoma tracheophila* Petri-I.— Phytopathol. Zs., 1957, **31**, 25.

154. Green R., Jr. A preliminary investigation of toxins produced in vitro by *Verticillium albo-atrum*.— Phytopathology, 1954, **44**, 433.

155. Groger D. Weitere Untersuchungen über den Alkaloidstoffwechsel des Mutterkorns.— Kulturpflanze, 1958, **6**, 243.

156. Groger D. Untersuchungen zur Biosynthese der Mutterkornalkaloide.— Zs. Naturforsch., 1959, **14b**, 355.

156a. Haemi A., Barbier M., Lederer E. Sur la structure de l'aspergillomarasmine A.— C. r. Acad. sci., 1962, **255**, 1476.

156b. Hartley R., Nesbitt B., O'Kelly J. Toxic metabolites of *Asp. flavus*.— Nature (Ind.), **198**, 1963, 4485, 1056.

157. Hecht M., Hecht W. Vergleichende Untersuchunge über Physiologie und Chemie von Leukosklerotien bei Mutterkorn.— Pharmazie, 1954, **9**, 424.

158. Heath H., Wildly I. The biosynthesis of ergothionine and histidine by *Claviceps purpurea*. I. The incorporation of (2—C^{14}). II. The incorporation of (3^5S) methionine and the non-utilization of ($2^{14}C$) histidine.— Biochem. J., 1956, **63**, 32; **64**; 612.

159. Heath H., Wildly I. Biosynthesis of ergothionine by *Claviceps purpurea*. 3. Incorporation of labelled histidine.— Biochem. J., 1958, **68**, 407.

160. Heim R., Wasson R. Les champignons hallucinogênes du Mexique. Etudes ethnonologiques, toxinomiques, biologiques, physiologiques et chimiques.— Arch. Museum nat. histoire nature, 1958, **6**, 15.

161. Howward B., Raistrick H., 1949, 1954, Studies in the biochemistry of microorganisms. The colouring matters of *Penicillium islandicum* Sopp. Pt 1, **2**, 3, 4.— Biochem. J., 1949, **44**, 227; **46**, 49; 1954, **56**. 56; **57**, 212.

162. Iizuka H., Iida M. Maltoryzine a new toxic metabolite produced by a strain of *Aspergillus oryzae* var. *microsporus*, isolated from the poisonous malt sporus.— Nature, 1962, **196**, 4855, 681.

162a. Jacquet J., Boutibomes P., Cecile J. Observations sur la toxicité *d'Aspergillus clavatus* pour des animaux.— Bull. Acad. vét. franc., 1963, **36**, 199.

162b. Jung M., Rochelmeyer H. On morphology and cytologyes *Claviceps purpurea* (Tul.) in Saprophybic culture.— Beitr. Bid. Pflanzen., 1960, **35**, 343.

163. Kalyanasundaram R., Saraswathi-Devi L. Zinc in the metabolism of *Fusarium fasinfectum* Atk.— Nature, 1955, **175**, 945.

164. Kalyanasundaram R., Vencata Ram C. Production and systemic translocation of fusaric acid in Fusarium-infected cotton plants.—J. Ind. Bot. Soc., 1956, **35**, 7.

165. Kalyanasundaram R., Subba-Rao N. The effect of temperature on production of fusaric acid in vivo.— Current Sci., 1957, **26**, 56.

166. Kalyanasundaram R. Studies on an Antagonist of the phytotoxin Fusaric acid.— Phytopathol. Zs., 1960, **38**, 3, 15.

167. Kern H. Die Verteilung der radioaktiven Fusarinsäure in Tomatensprossen.— Phytopathol. Zs., 1957, **30**, 31.

167a. Kiss J. Welkstoffe und Antibiotica. Über Isolierung von Culmomarasmin einem peptidartigen Welkstoff aus dem Kulturfultrat von *Fus. culmorum*.— Helv. Chim. Acta, 1960, **43**, 2096.

168. Kobayashi I. et al. Toxicological studies on the yellowed rice by *P. islandicum* Sopp. I. Experimental approach to liver injuries by long term feedings with the noxious fungus on mice and rats.— Proc. Japan Acad., 1958, **34**, 639.

169. Kobayashi L. et al. Isolation of the two toxic substances from the noxious fungus, and their chemical and biological properties.— Proc. Japan Acad., 1958, **34**, 736.

170. Krupka L. Metabolism of oats suspectible to *Helminthosporium victoriae* and victorin.— Phytopathology, 1959, **49**, 587.

171. Lakshminarayanan K., Subramanian D. Is fusaric acid a vivotoxin?— Nature, 1955, **176**, 697.

171a. Lancaster M., Jenkins F., Philp J.— Toxicity associated with certain samples of groundnuts.— Nature, 1961, **192**, 1095.

171b. Lierstad G. Intermediary metabolism of ergot.— Planta med., 1962, **10**, 267.

172. Litzenberger S. Nature of susceptibility to *Helminthosporium victoria* and resistance to *Puccinia coronata* in Victoria oats.— Phytopathology, 1949, **45**, 300.

173. Ludwig R. Toxin production by *Helminthosporium sativum* P. K., et B and significance in disease development.— Canad. J. Bot., 1957, **35**, 291.

174. Luke H., Wheeler H. Toxin production by *Helminthosporium victoriae*.— Phytopathology, 1955, **45**, 453.

175. Meehan F., Murphy H. Differential phytotoxicity of *Helminthosporium victoriae*.— Science, 1947, **106**, 270.

176. Miescher A. Über die Wirkungsweise von Patulin auf höhere Pflanzen, ins besondere auf *Solanum lycopersica*.— Phytopathol. Zs., 1950, **16**, 369.

176a. Mirocha C., Wilson E., Davay G. The role of fumaric acid, a fungal toxin, involved in the hull rot disease of almond.— Phytopathology, 1960, **50**, Abstr. 52 ann. meet. Amer. Phytopathology Soc.

177. Morooka N. Studies on the toxin products of *Penicillium islandicum*. I. On a toxic pigment produced by surface culture.— Japan J. Med. Sci. Biol., 1956, **9**, 121.

178. Mother K., Silber A. Über die Variabilität des Mutter-korns.— Forsch. Fortschr. dtsch. Wiss., 1954, 28, 101.

179. Накашима Т. и др. Изучение фузариновой кислоты и ее аналогов.— РБЖ, 1959, 21, 91786.

180. Nesbitt B. et al. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*.— Nature, 1962, **195**, 1060.

181. Nickerson N. Hallucinogenic fungi.— Missouri Bot. Garden Bull., 1961, **49**, 101.

182. Нишимура. Токсины *Fusarium niveum* Smith и их действие. Изучение устойчивости растений к различным болезням.— РБЖ, 1958, 6926.

182а. Нишимура С. Фузариновая кислота, выделяемая грибами р. *Fusarium*.— РЖБ, 1959, **9**, 39422.

183. Oltnoff H., Estey R. Nematotoxin produced by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* Fres.— Nature, 1963, **197**, 514.

184. Oku H., Nacanishi T. A toxic metabolite from *Ascochyta fabae*.— Phytopathology, 1963, **53**, 1321.

184а. Orsenigo M. Roduzione di tossine de parte di *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan. Pt. 1.— Ann. sperim. agr., 1956, **10**, 1745.

185. Orsenigo M. Estrazione e purificazione della Cochliobolina, una tossina prodotta da *Helminthosporium oryzae*.— Phytopathol. Zs., 1957, **29**, 189.

186. Orsenigo M. Sostanze tossiche prodotte da funghi e batteri fitopatogeni.— Ann. microbiol., 1960, **10**, 146, 170.

187. Overell B. A toxin in culture filtrates of *Sclerotinia sclerotium*.— Austral. J. Sci., 1952, **14**, 197.

188. Paquin R. Mécanisme du fletrissement des plantes.— Agriculture (Canad.), 1957, **14**, 126.

189. Patrick Z., Tousson T., Snyder W. Phytotoxic substances in arable soils associated with decomposition of plant residues.— Phytopathology, 1963, **53**, 153.

189а. Pidoplichko M., Moskovets V., Zhdanova N. Influence of some fungi from the maize rhizosphere on the growth of its seedlings. Proc. Sympos. on Rel. Soil microorganisms, Prague, 1965, 220.

190. Prentice N., Dickson A., Dickson I. Production of emetic material by species of Fusarium.— Nature, 1959, **184**, 4695, Suppl. 17, 1319.

191. Plattner P. et al. Konstitution und synthese der Fusarinsäure.— Helv. chim. acta, 1954, **37**, 1379.

192. Pringle R., Braun A. The isolation of the toxin of *Helminthosporium victoriae*.— Phytopathology, 1957, **47**, 369.

193. Pringle R., Braun A. Constitution of the toxin of *Helminthosporium victoria*.— Science, 1958, **181**, 4617, 1205.

194. Pringle R., Braun A. Isolation of Victoxinine from culture of *Helminthosporium victoriae*, Phytopathology, 1960, **50**, 324.

195. Pyan G., Greenblatt G., Al. Delaimy K. Seedling albinism induced by an extract of Alternaria tenuis.— Science, 1961, 154.

196. Rau E., Tilden E., Koenig V. Partial purification and characterization of the endotoxin from *Aspergillus fumigatus*.— Mycopathol. et mycol. appl., 1961, **14**, 347.

197. Resplandy R., Resplandy A. Elaboration in vitro de substances alkaloidiques par quelques champignons phytopathogènes.— C. r. Acad. sci., 1959, **248**, 1400.

198. Ronnebeck W. Ein phytotoxisches Prinzip aus *Phytophtora infestans* de Bary.— Zs. Pflanzenkrankh, 1956, **63**, 385.

199. Sandhu R. Studies on the biogenesis of fusaric acid.— Phytopathol. Zs., 1959, **37**, 33.

200. Sargeant K. Toxicity associated with certain samples of groundnuts.— Nature, 1961, **192**, 1096.

201. Sanwal B. Investigation on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon.— Phytopathol. Zs., 1956, **25**, 333.

202. Sanwal B., Waygood E. The effect of fusaric acid on the oxidative phosphorylation of plant mitochondria.— Experientia, 1961, **17**, 174.

203. Scheffer R., Pringle R. A selective toxin produced by *Periconia circinata*.— Nature, 1961, **191**, 912.

204. Scheffer R., Pringle R. The physiological action on *Helminthosporium victorium* toxin.— Phytopathology, 1962, **52**, 750.

205. Scheffer R., Pringle R. Toxicity of Victoxinine.— Phytopathology, 1963, **53**, 558.
206. Seidel H. Untersuchungen über den Nährstoffbedart und die Toxinbildung des Pilzes Phytophthora infestans (Mont) de Bary in vollsynthetischen Nährlösungen, Phytopathol., Zs., 1961, **41**, 1.
207. Sherwood R., Lindberg. Production of a phytotoxin by *Rhizoctonia solani*.— Phytopathology, 1962, **52**, 586.
208. Shibata S., Takido M., Nakajima T. Studies in the metabolic products of fungi. VII. Paper chromatography of the colouring matters of *Penicillium islandicum* Sopp.— Pharmacol. Bull., 1955, 3, 286.
209. Silber A., Bischoff W. Die Konstanz des Alkaloidgehaltes beiverschiedenen Rassen von Mutterkorn.— Pharmazie, 1964, **9**, 46.
210. Smith R., McKernan W. Hepatoxic action of chromtoagraphically separated fractions of *Aspergillus flavus* extracts.— Nature, 1962, **195**, 1301.
210a. Spensleu P. Aflatoxine, the active principle in Turkey «X» disease.— Endavour, 1963, **22**, 75.
211. Taber W., Vining L. In vitro production of ergot alkaloids by cultures of *Claviceps purpurea*.— Canad. J. Microbiol., 1957, **3**, 55; 1958, **4**, 611; 1959, **5**, 418; 1960, **6**, 355.
212. Taber W., Vining L. Physiology of alkaloid production by *Claviceps purpurea* (Ek). The correlation with changes in mycelial polyol carbohydrate, lipid and phosphorus-containing compounds.— Canad. J. Microbiol., 1963, **9**, 1.
213. Такахаси С., Ивама К. Аспергиллес легких у кроликов, полученный при помощи сенсибилизации клеточными компонентами *Aspergillus fumigatus*.— РБЖ, 1964, 8Б191.
214. Tamari K., Kaji I. Studies on the mechanism of injurious action of fusarinic acid on plant growth. r. 1—8.— J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1952, **26**, 223, 295, 345; 1953, **27**, 245, 302.
215. Tamari K. et al. Biochemical studies on the blast disease of rice plants. On the ingradients of rice plants, possesing the stimulating effects on the germination and the growth of blast mould spores.— Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 1960, **24**, A83; Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 1960, **25**, 142.
216. Tilden E., Williamson W., Koenig V. Preparation and properties of the toxins of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*.— Bacteriol. Soc. Amer. Bacter., 1960, **1**, 138.
216a. Tilden E., Freemen S., Lombard L. Further studies of the *Aspergillus endotoxins*.— Mycopathol. et mycol. appl., 1963, **20**, 253.
217. Тогаси К., Огасава Н., Тамари К. Биохимическое изучение пирикуляриоза риса. XVII. Влияние пирикулярина — токсина возбудителя на устойчивость растений риса к пирикуляриозу.— РБЖ, 1961, 19г, 729.
218. Turel F. Der Einfluβ von Aneurin und Zink auf das Wachstum und die Toxinproduction vo *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr.— Phytopathol. Zs., 1952, **19**, 307.
219. Vamazoe S. et al. Effects of poisons of *Penicillium islandicum* Sopp on the metabolism in isolated liver from animals.— J. Med. Sci., 1963, **12**, 73.
220. Vining L., Taber W. Alkaloids.— In.: Bioch. Ind. Microorganisms, Acad. Press Ind. Ed. C. Reinbow, A. Rose, 1963, 341.
221. Voigt R., Wichmann D. Zum Clavin-Stoffwechsel Roggenmutterkons in Saprophytischer Kultur.— Pharmazie, 1961, 16, 369.
221a. Voigt B. Über clavinalkaloide in Roggenmutterkorn. Beitrag zur Biogenese der Alkaloidi.— Pharmazie, 1962, **17**, 156.
222. Waart C., Taber W. Some aspects of phosphate metabolism of *Claviceps purpurea* (Fr) Tul.— Canad. J. Microbiol., 1960, **6**, 675.
222a. Wagner H. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub unter Berücksichtigung der Bildung des Welketoxines in vitro.— Phytopathol. Zs., 1961, **41**, 105.

223. Wasson V., Wasson R. The hallucinogenic mushrooms.— Bot. Garden, 1958, 8, 37.
224. Wheeler H. Detection of Microbial toxins by use of radioisotopes.— Phytopathology, 1953, **43**, 236.
225. Wheeler H., Luke H. Studies of a toxin agent product by *Helminthosporium victoriae*.— Phytopathology, 1954, **44**, 334.
226. White I. Toxin production by the oak wilt fungus *Eudoconidiophora fagacearum*.— Amer. J. Bot., 1955, **42**, 739.
227. Wibe O., Morton D. Inhibition of *Septoria passerinii* development in excised barley leaves by *Helminthosporium sativum* and by cell-free filtrates.— Phytopathology, 1962, **52**, 373.
227a. Wilson B., Wilson C.— Extraction and preliminary characterization of a hepatotoxic substance from culture *Penicillium rubrum*.— J. Bacter., 1962, 84, 283; там же, 1962, **83**, 693.
228. Wynston E., Tilden E. Chromatographic fractionation of *Aspergillus* endotoxins.— Mycopathol. et mycol. appl., 1963, **20**, 272.
229. Zähner H. Die Bestimmung der Fusariumsäure mit Hilfe der Papierchromatographie.— Phytopathol. Zs., 1954, **23**, 49.
230. Zijden A. S. M. et al. *Aspergillus flavus* and turkey X disease.— Nature, 1962, **195**, 1060.
231. Хироэ, Нисимура, Патохимическое изучение увядания арбуза. II. О некоторых физических и химических свойствах фитонивеина, токсина увядания, образуемого грибом, и физиология обмена веществ этого гриба.— РБЖ, 1957, **18**, 78405.
232. Ямамото. Изучение продуктов обмена *Penicillium islandicum* Sopp.— РБЖ, 1956, **22**, 103420.

IV. ПРЕВРАЩЕНИЕ СЛОЖНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Превращение и синтез сложных органических соединений микроорганизмами в последнее время является предметом изучения многих ученых в СССР и за рубежом. Наряду с исследованиями по трансформации стероидов и сердечных гликозидов изучается превращение фенолов и их производных, углеводородов и других сложных органических веществ.

ПРЕВРАЩЕНИЕ СТЕРОИДОВ

Стероиды — сложные эфиры жирных кислот и высокомолекулярных циклических спиртов. Основу их химической структуры составляет скелет гидрированного 1,2-циклопентанфенантрена, к которому присоединены различные радикалы. Встречаются стероиды в растительных и животных клетках, играют важную роль в процессах обмена веществ и обладают высокой степенью физиологической активности.

К этому классу химических соединений относятся такие физиологически активные вещества, как холестерин, желчные кислоты, гормоны пола и коры надпочечников и др.

Многие растительные стероиды являются дешевым сырьем при химическом синтезе различных стероидных соединений.

Гормональные препараты стероидного строения имеют важное значение в медицине, ветеринарии, животноводстве, так как необходимы при лечении многих заболеваний, сопровождаемых нарушением или ослаблением различных сторон обмена веществ и гормональной деятельности организма. Они регулируют обмен холестерина и витаминов D, углеводный, белковый и солевой обмен, стимулируют сердечную и половую деятельность организма. Препараты стероидного строения находят широкое применение в медицине при лечении некоторых злокачественных опухолей, при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, расстройствах половой сферы, нормального течения беременности, болезнях матки и маточных кровотечениях, некоторых аллергических и кожных заболеваниях, а также при

ревматических артритах. Применяются также в животноводстве как стимуляторы роста молодняка, увеличения яйценоскости кур.

Изучена химическая природа и осуществлен синтез многих стероидных препаратов. Химическое превращение стероидов может происходить путем гидроксилирования в разном положении атома углерода в их молекуле, окисления спиртовых групп в кетоны, дегидрирования, гидролитического расщепления С—С связей, эпоксидирования, разрыва кольца, смешанных реакций и др.

Особое внимание в последние годы уделено изучению кортизонов и их производных. В качестве природного сырья используют растительные стероиды — диогенин, соласодин, стигмастерин, стигмастрол, эргостерин дрожжей, стероидные гликозиды некоторых растений.

Получение препаратов синтетическим путем сопровождается многоступенчатыми сложными химическими реакциями и требует длительного времени. Как сообщается в обзорной работе Стоудта по микробиологической трансформации стероидов [66], синтез кортизонацетата из деоксихолиновой кислоты был осуществлен в результате проведения 32 химических реакций. Петерсон и Муррей [50] впервые описали наиболее трудную химическую реакцию при синтезе кортизона — гидроксилирования прогестерона в положении 11α, осуществляемую грибом *Rhizopus nigricans* с образованием 11 α-гидроксипрогестерона (введение атома «О» к 11 α углеродному атому стероидного скелета) (рис. 50). Широкое изучение превращений многих стероидных соединений — предшественников кортизонов и их производных — различными микроорганизмами показало, что они специфически осуществляют реакции в отношении стереохимической конфигурации молекулы субстрата и получаемого производного. Более того, в результате реакций трансформации, осуществляемых некоторыми микроорганизмами, получаются производные кортизона, обладающие значительно большей гормональной активностью, чем природные гормоны. Как видно из рис. 51, ферментные системы микроорганизмов могут гидроксилировать определенные атомы углерода с образованием новых производных, которые не отмечены у млекопитающих.

Ферментные системы микроорганизмов сходны с системами млекопитающих в гидроксилировании стероидов, гидрогенировании, в реакции разрушения боковых цепей, гидролиза эфиров и ароматизации кольца А.

Использование окислительных систем микроорганизмов при воздействии на определенные соединения позволило в промышленном масштабе получать ценные гормональные препараты.

По микробиологической трансформации стероидов имеется ряд обзорных работ [32, 51, 52, 65, 72], серия работ Чапека с

сотрудниками [22—29], советских [1—12] и японских [17—19, 41, 42, 45, 49, 60, 61] авторов и др. В настоящем разделе кратко приведены сведения из этих публикаций, касающиеся изучения трансформации стероидов различными видами грибов (табл. 53—57).

Согласно литературным данным, микроскопические грибы наиболее активны в осуществлении многообразных реакций

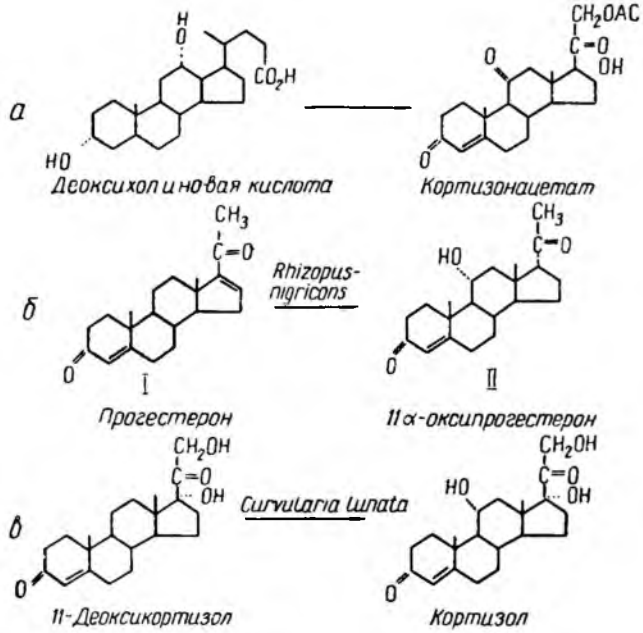


Рис. 50. Гидроксилирование стероидов *Rhizopus nigricans* (по Peterson):

а — схема получения кортизонацетата при помощи 32 ступеней химических превращений диоксихолиновой кислоты; *б* — схема получения 11α-оксипрогестерона (II) при гидроксилировании прогестерона (I); *в* — схема получения кортизола при гидроксилировании *Curvularia lunata* 11-деоксикортизола в положении 11β.

гидроксилирования стероидов. Разные их виды производят эту реакцию в различных положениях атома углерода молекулы стероида и при этом дают высокий выход превращенного соединения.

Виды *Rhizopus* неодинаково осуществляют гидроксилирование различных стероидов. Так, *Rhizopus arrhizus* и *Rh. cambodjae* производят его в положении 6β, 11α, а некоторых субстратов — в положении 7β, 11α. *Rh. nigricans* — преимущественно в положении 11α. Как упоминалось, эта реакция наиболее

трудно достижима химическим путем, а при осуществлении ферментными системами *Rh. nigricans* она сопровождается высоким выходом продукта превращения — 11α-оксипрогестерона (табл. 53).

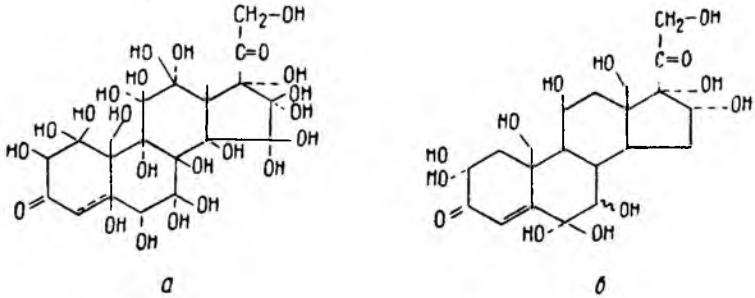


Рис. 51. Ферментативное превращение стероидов в различном положении атома углерода в их молекуле:

а—микроорганизмами (1α, 1β, 2β, 5β, 6β, 7α, 7β, 8β (?), 9α. 10β, 11α, 11β, 12α, 12β, 14α, 15α, 15β, 16α, 16β, 17α, 19, 21); *б*—млекопитающими (2α, 2β, 6α, 6β, 7, 11β, 16α, 17α, 18—, 19—, 21, 22) (по Peterson).

Асаи и др. [19] изучили 284 штамма разных видов мукоровых и только у 21 обнаружили способность к гидроксилированию прогестерона в 11α-оксипрогестерон.

Таблица 53

Превращение стероидов видами *Rhizopus*

Вид гриба и название субстрата	Характер трансформации		
	6 β в	7 β в	11 α в
Rhizopus arrhizus			
Прогестерон 17α-ол	6β (+немного 11α)	—	—
Кортизон	То же	—	—
Прогестерон	6β, 11α	—	11α+6β
Δ^4 андростен-3, 17-дион	6β (+11α)	—	
Аллопрегнан-3β-ол, 20-OH	—	7β	—
Прегненолон	—	7β 11α	—
Rhizopus cambodjae			
Прогестерон	6β	11α	—
Rhizopus nigricans			
Прогестерон	—	—	11α
Аллопрегнан-3β, 21-диол 20-OH	—	7β	—

В опытах авторов наиболее высокоактивный штамм культивировался на среде, содержащей 5% глюкозы, 2% пептона, 0,3% кукурузного экстракта (pH 5,2) в течение 48 *час* на качалке. После добавления раствора прогестерона (50 *мг*/100 *мл*) инкубация продолжалась еще в течение 48 *час*. Этил-ацетатный экстракт хроматографировали на Al_2O_3; в качестве растворителя использовали смесь бензола и эфира.

При изучении продуктов трансформации стероидов в динамике авторами установлено, что *Syncephalastrum* sp. при инкубировании с раствором прогестерона (100 *мг*/100 *мл*) в первые 6 *час* образует диоксипрогестерон, после 48—72 *час* — триоксипрогестерон.

При глубинном методе культивирования *Rh. nigricans* на минерально-глюкозной среде с незначительным содержанием азота (0,03—0,02%), глюкозы (до 3%) рост мицелия гриба несколько задерживается по сравнению с ростом на среде с 0,5—0,3% азота, но активность окислительных ферментов значительно возрастает. Это способствует более высокому выходу 11α-гидроксипрогестерона, который в виде нерастворимых характерных кристаллов призматической или ромбической формы обнаруживается в среде [12].

Кроме гидроксилирования прогестерона в положении 11α атома углерода с образованием соответствующих оксипроизводных, *Rhizopus nigricans* гидрогенирует кольца Δ^{16} прогестерона в 11α-гидроокси-17α-прогестерон, карбониловбизнор 4-холен-22 ал-3 дион в 11α, 22 дигидроксибизнор 4-холен 3.

Из других видов мукоровых грибов гидроксилирование в положении 11α осуществляет *Cunninghamella blakesleeana; Mucor corymbifera* гидроксилирует в положении 6β с образованием 6-β и 14β-оксипроизводных, а *Mucor parasiticus* — в положении 8 или 9 с образованием аналогичных производных (табл. 54).

Таблица 54

Гидроксилирование стероидных производных некоторыми видами мукоровых грибов

Cunninghamella blakesleeana, Absidia glauca		*Mucor corymbifera*		*Mucor parasiticus*	
Субстрат	11 α в	Субстрат	6 β в	Субстрат	8 или 9 в
Соединение (11-диоксикортизол)	11α, 11β	4-андростен-3, 17-дион Прогестерон	6β, 14 6β, 14	Деоксикортикостерон	8 или 9

Ерошин, Красильников [4а] сообщают о превращении гидрокортизона в кортизон грибом *Cunninghamella elegans*.

Гриб предварительно выращивали в течение трех суток на среде, содержащей 10 *г* глюкозы, 5 *г* кукурузного экстракта, 5 *г* пептона и 5 *г* NaCl в 1 *л* воды. После этого срока под промытую водой пленку вводили суспензию (2 *г* мела в 50 *мл* воды и 10 *мг* гидрокортизона в 2 *мл* воды) и ферментировали еще на протяжении двух суток.

Хроматографически, а также по другим физико-химическим свойствам в культуральной жидкости и хлороформном экстракте из нее установлено наличие кортизона.

Дюлани, Стэрли, Главач [30], испытав 475 культур 38 видов *Aspergillus* и 476 культур 96 видов *Penicillium*, установили, что для изученных видов аспергиллов также характерно гидроксилирование стероидных производных в положении 11α, для отдельных видов — 11α и 17β с образованием 11α и 6β-, а также 21α-оксипроизводных (табл. 55). Культуры видов пенициллов в опытах авторов были почти неактивны, только три из 476 гидроксилировали прогестерон в положении 11α, но более характерным для них было гидроксилирование атома углерода в положении 15.

Таблица 55

Гидроксилирование стероидных производных отдельными видами аспергиллов

Aspergillus niger		*Aspergillus ochraceus*		*Aspergillus nidulans*	
Субстрат	11 α, 21 α в	Субстрат	11 α, 6 β в	Субстрат	6 β в
Прогестерон	11α; 11α 6β; 21α, 11α	Прогестерон 4-Андростен-3, 17-дион	11α; 11α, 6β, 6β, 11α	Прогестерон 162 ол	6β, 12

Активность гидроксилирования прогестерона различными штаммами рода *Aspergillus* изучали Иизука и др. [41, 42]. Из 473 бывших в опыте штаммов наиболее активными оказались *Asp. niger, Asp. saitoii, Asp. awamori*. Авторы отмечают стимулирующее влияние на окисление прогестерона добавления в среду нитрата аммония. Наиболее активный штамм в их опытах за 48 *час* полностью окислял внесенный прогестерон и на 69,5% превращал его в 11α-оксипрогестерон, на 30,5% — в 6β, 11α-диоксипроизводные. Разные штаммы отличались количественным соотношением указанных продуктов превращения.

Викс, Вейс, Боданский [76] в опытах по определению активности разных штаммов *Asp. niger* в отношении превращения

прогестерона в 11-эпикортикостерон установили, что при превращении прогестерона в среде образуется α-оксипрогестерон, 11α, 21-диоксипрогестерон и 11-эпикортикостерон. Последний выделен в кристаллическом виде. Авторы отмечают, что среди изученных штаммов *Asp. niger* были культуры, не активные в отношении окисления прогестерона в положении 11α.

Влияние условий культивирования на активность окисления прогестерона *Rhizopus nigricans* и *Aspergillus ochraceus* изучили Уивер, Кэннэй, Уоол [74]. Положительное действие, по их данным, оказывает тонкое измельчение и равномерное диспергирование прогестерона в среде, что достигается растворением его в 0,01%-ном водном растворе «Твин 80». При этом условии используемый штамм *Rh. nigricans* осуществлял трансформацию прогестерона с образованием 11α-оксипрогестерона при концентрации 8 *г/л,* а штамм *Asp. ochraceus* — при концентрации 20 *г/л* со 100%-ным выходом оксипрогестерона и при концентрации 50 *г/л* с выходом до 65%. При низких концентрациях прогестерона (0,5—1 *г/л*) образуется значительное количество 6β, 11α-диоксипрогестерона. Отмечено также, что при добавлении высоких концентраций прогестерона для трансформации до 95% образовавшегося 11α-прогестерона было в мицелии. Изучено влияние продуктов трансформации на грибы.

Чапек и Ганч [24] изучили трансформацию стероидов у 98 штаммов 24 видов и 11 разновидностей рода *Fusarium.* Отмечено два типа реакций, осуществляемых разными видами. Первая — расщепление боковой цепи прогестерона, сопровождающееся дегидрогенированием стероидного скелета в положении 1—2. В качестве промежуточных продуктов этой реакции образуется равная смесь Δ^4 андростен-3,17-диона и тестостерона, а конечным ее продуктом является тестолактон. Этот тип реакции установлен у *F. lateritium, F. caucasicum, F. solani.* Для большинства остальных изученных видов характерной реакцией является гидроксилирование Δ^4 андростен-3,17-диона до положения 15α и 6β-производных. Изучено влияние условий культивирования на процесс трансформации.

Эти же авторы испытали 191 культуру 94 видов *Penicillium* в отношении превращения прогестерона [28].

Грибы выращивали на качалке при 27° С в течение 48 *час* на среде следующего состава: 30 *г* глюкозы, 3 *г* $NaNO_3$, 0,4 *г* KH_2PO_4, 0,2 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ на 1 *л* воды (pH 5,4). После этого срока культивирования добавляли спиртовой раствор прогестерона (10 *мг* на 10 *мл* среды). Через 4, 8, 16, 24, 48 и 72 *час* путем хроматографирования определяли образуемые в культуральной жидкости продукты превращения. Для хроматографирования на бумагу наносили хлороформный экстракт культуральной жидкости, содержащей 1 *мг* прогестерона в исходном растворе. Бумагу насыщали смесью формалина и этанола (1 : 1)

и затем экстракт разгоняли в системе растворителей, состоящей из бензина и лигроина (1 : 1); проявляли смесью р-фенилендиамида и фталиевой кислоты или водным раствором йода. Гидроксипроизводные прогестерона в положении 11α давали темно-голубое окрашивание с йодом, а в 15β — желтое.

Результаты проведенных опытов позволили авторам отметить три основные группы превращения прогестерона различными видами пенициллов. К первой относятся виды, осуществ-

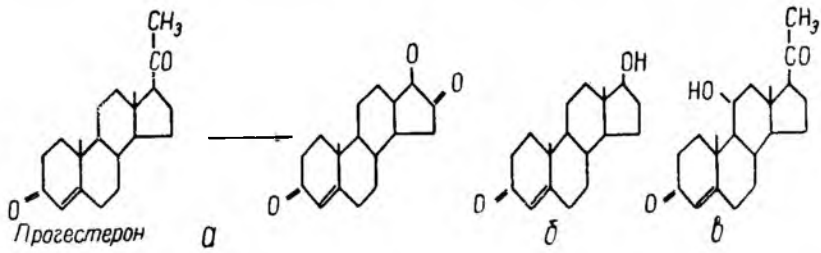


Рис. 52. Превращение стероидов видами р. *Penicillium* (по Čapek).

Образование из прогестерона тестолактона (*а*), тестостерона (*б*) и 11 α гидроокси-прогестерона (*в*).

ляющие отщепление боковой цепи прогестерона в положении C_{17} с образованием тестолактона и тестостерона, как конечных продуктов. Ко второй — виды, гидроксилирующие прогестерон в положении 11α, и к третьей — в положении 15β стероидного скелета (рис. 52). Ряд видов неактивны в отношении превращения прогестерона.

Кроме упомянутых видов аспергиллов, гидроксилируют стероидные производные в положении 11 α с образованием аналогичных оксипроизводных также *Neurospora sitophila* и *Pestallotia faedans, Cunninghamella blakesleeanus; Curvularia lunata* и другие виды этого рода грибов гидроксилируют в положении 11β с образованием аналогичных и некоторых других оксипроизводных (табл. 56). При изучении трансформации стероидов разными видами рода *Curvularia* [77] было установлено, что *C. lunata* осуществляет трансформацию некоторых стероидов и в положении 7 β.

Виды фузариев, как уже отмечалось, гидроксилируют молекулы стероидов преимущественно в положении 15 углеродного атома с образованием соответствующих оксипроизводных; *Trichothecium roseum* — в положении 17; *Ophiobolus herpotrichus* в положении 21 (табл. 57). Установлена способность многих видов грибов осуществлять введение кислорода в определенном положении атома углерода в молекуле стероидов (*Rhizoctonia ferrugena* — $C_{1,2}$, *Absidia orchidis* — C_5, *Helicostylum periforme, Neurospora crassa, Circinella* sp.— $C_{8,9}$, *Calonectria decora, Colletotrichum phomoides, Thamnidium elegans* — C_{12},

Таблица 56

Гидроксилирование стероидов в положении 11β разными видами грибов

Curvularia lunata		*Cunninghamella blakesleeanus*		*Trichothecium roseum*	
Субстрат	11 β в	Субстрат	11β в	Субстрат	11β в
Прогестерон	11β, 11β+21	Прогестерон	11β	Вещество «S»	11β
Прогестерон 17-ал	11β; 11β, 14α	Кортексон	11β (+14α)	—	—
Кортексон	11β	—	—	—	—

Таблица 57

Гидроксилирование стероидов разными видами грибов

Гриб	Субстрат	Характер трансформации	
		Изменение молекулы в положении	Образуемые производные
Penicillium sp.	Андростен-3, 17-дион	1α, 2β	1α+2β
То же	Прогестерон	15α	15α
Pen. urticae	То же	15α	15α
Pen. notatum	»	15α	15α
Fusarium sp.	Прогестерон и другие стероиды	15α	15α 15α
Gibberrela sp.	Кортизон	15α	15α+15β
Trichothecium roseum	Кортизон, кортикостерон, кортикостерон-11-дегидро	17α	17α+ 6β 17α+11CO 17α
	Прогестерон	21α	21α
Ophiobolus herpotrichus	Так же 17 од	21α	21α
	» 11 он	21α	21α

Helicosporium sp. — C_{14}, *Phycomyces blakesleeanus, Colletotrichum antirrhini* — C_{15}, *Helicostylum piriforme* — $C_{16,6,11,14,9}$, *Woynowicia graminis* — C_{16}, *Cephalosporium roseum* — C_{17}, *Corticium sasaki, Pellicularia filamentosa* — C_{19}, *Ophiobolus herpotrichus* — C_{21}) [52].

Многими авторами изучены многочисленные культуры разных видов мицелиальных грибов, дрожжей, актиномицетов, бактерий в отношении их способности разрушать определенные звенья молекулы стероидов и образования их производных. Установлено, что наряду с наиболее частой для грибов реакцией гидроксилирования, одиночной или множественной, определенные виды могут осуществлять реакции окисления с обра-

зованием кетонов, эпиоксидирования, разрушения боковой цепи с образованием лактона или без лактонизации кольца Д, введения двойных связей в ядро без разрушения и с разрушением боковой цепи, а также разнообразные и смешанные реакции.

Вишер и Уайттштейн [72] отмечают такие виды грибов, осуществляющие введение одной-двух двойных связей и разрушение боковой цепи молекулы стероидов.

Грибы, вводящие одну-две двойные связи в кето-стероиды.

Без разрушения боковой цепи; действуют со всеми стероидами:

1. *Alternaria* sp.
2. *Calonectria decora*
3. *Ophiobolus* sp.
4. *Digymella lycopersici*
5. *Septomyxa affinis*

Действуют только с 17α-гидрооксистероидами.

6. *Fusarium solani, F. caucasicum*
7. *Cylindrocarpon radicicola*

С разрушением боковой цепи (до 17 кетонов и (или) 17β-карбинолов и (или) кольцевых Д-лактонов только с 17α-диоксистероидами):

9. *Fusarium solani, F. caucasicum* (только с 17α-диоксистероидами)
10. *Cylindrocarpon radicicola*
11. *Pycnodothis* sp.

Грибы, разрушающие боковую цепь без 1, 2-дегидрогенирования

12. *Gliocladium catenulatum*
13. *Penicillium lilacinum*
14. *Penicillium adametzii*
15. *Aspergillus flavus*
16. *Penicillium chrysogenum*
17. *Aspergillus flavipes*
18. *Mucor mucedo*
19. *Aspergillus suinus*
20. *Cephalosporium subverticillatum*
21. *Fusarium solani*
22. Разные *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.

Результаты указанных исследований сделали возможным использование комбинированного микробиолого-химического синтеза для получения в промышленном масштабе многочисленных производных стероидов, обладающих высокой физиологической активностью. Получаемые при микробиологической трансформации стероидов гормональные препараты, аналоги

или производные кортизона, нередко превосходят по биологической активности природные гормоны.

Эстрон — женский половой гормон — получается химическим путем из дегидроэпиадростерон ацетата или комбинированным, химико-микробиологическим путем. В последнем случае микробные клетки используются для дегидрогенирования А-кольца в 1—2 положении, приводящего к образованию Δ 1,4 андростадиен-3,17-диона.

Как отмечают Чапек и Ганч [29], при комбинированном получении эстрона число реакций сокращается с шести до че-

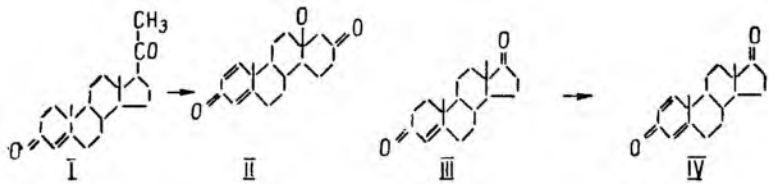


Рис. 53. Превращение стероидов *Fusarium lateritium* (по Capek):

I — исходное соединение для трансформации *Fus. lateritium* прогестерон; II — конечное соединение *l*-дегидротестольлактон; III — исходное соединение Δ^1-андростэн-3,17-дион; IV — конечное соединение: $\Delta^{1,4}$-андростадиен-3,17 дион (9 частей), *l*-дегидротестольлактон (1 часть).

тырех и повышается выход гормона. Для комбинированного его получения различными авторами применялись штаммы *Pseudomonas* sp., но при этом из прогестерона или Δ^4 антидростен-3,17-диона образовывалась смесь стероидных производных — андростадиен-3,17-дион и *l*-дегидротестостерон в качестве промежуточных продуктов и *l*-дегидротестолактон как конечный продукт.

Авторами был использован штамм *Fusarium lateritium* 403. Превращение *Fus. lateritium* упомянутого соединения почти не сопровождалось образованием нежелательного промежуточного метаболита *l*-дегидротестолактона (обнаружено около 2% его), в то время как при использовании прогестерона как исходного соединения образование *l*-дегидротестолактона доходило до 40% (рис. 53).

Гриб выращивали на среде с 1,5% глюкозы, 0,1% KH_2PO_4, 0,05% $MgSO_4$, 0,2% пептона; pH до 5,5 доводили перед стерилизацией 10%-ной H_3PO_4. При выращивании на качалке в колбах емкостью 750 *мл* посев 100 *мл* среды производили взвесью конидий из агаровой культуры *Fus. lateritium* 403 10—14-дневного возраста; при выращивании в 20-литровых лабораторных ферментерах посев 10 *л* среды производили 100 *мл* 24-часового инокулюма на качалке. Концентрация субстрата (Δ^4-андростен 3,17-диона) — 20 *мг*/100 *мл* среды. Продукты трансформации изучали хроматографическим методом. После окончания *l*-дегидрогенирования исходного субстрата к культураль-

ной жидкости, отделенной от мицелия, добавляли 2% глюкозы и 1% хлебных дрожжей для восстановления кетогруппы до C_{17} с образованием 17β-гидрооксипроизводного.

Разработан метод получения препарата и контроля его ферментации, при котором выход составлял до 50—60% по отношению к исходному стероиду. Чапек и сотрудники показали, что *Aspergillus oryzae, Asp. chevalieri* и *Pen. citrinum* способны осуществлять превращения прогестерона, связанные с расщеплением Д-кольца стероида и образованием лактонного кольца.

При использовании *Cladosporium resinae* в ферментации прогестерона были выделены андростендион, тестостерон и ацетат тестостерона, образование которого связано с разрушением боковой цепи [7, 7а]. Образование ацетатов стероидов установлено также в процессе ферментации 16α, 17α-изопропиледендиоксистероидов культурой *Trichoderma glaucum*.

Шлег и Найт [58] показали, что превращение прогестерона в 11α-гидроксипрогестрон конидиями *Asp. ochraceus* имеет преимущества по сравнению с подобным превращением, производимым вегетативными клетками мицелия.

Везина и Сегал [71] провели сравнительное изучение активности трансформации стероидов интактными конидиями и вегетативными клетками мицелия *Asp. ochraceus* и других, уже изученных в отношении превращения стероидов, видов грибов и актиномицетов.

Грибы выращивали на декстринном агаре Сабуро или зерне ячменя; готовили взвесь конидий в дистиллированной воде, 1%-ном фосфатном буфере (pH 7,0) и 1 : 10 000 растворе «Твин—80»; затем взвесь фильтровали через стеклянную вату, центрифугировали. После центрифугирования промывали 1%-ным фосфатным буфером, содержащим 0,005% «Твин—80» и дистиллированной водой. Наиболее благоприятным для трансформации прогестерона было содержание конидий *Asp. ochraceus* в 2×10^8 *мл*. Среда содержала 0,25% глюкозы и 0,05—0,1% спиртового, ацетонового или пропиленгликолевого раствора прогестерона. Необходима сильная аэрация среды. Продолжительность трансформации — 16—24 *час*.

Интенсивность трансформации прогестерона конидиями *Asp. ochraceus* зависит от температуры, свойств и концентрации субстрата, концентрации глюкозы и других условий. После окончания опыта реакционную смесь центрифугировали, и конидии, вновь взвешенные в той же среде с фосфатным буфером, прогестероном и глюкозой, могли использоваться для превращения прогестерона. По данным авторов, одну партию конидий можно использовать для превращения разных стероидов до 13 раз. При этом процесс трансформации спорами происходит более направленно, без образования значительного количества побочных продуктов.

В биологическом отношении возникающие специфические превращения молекулы стероидного субстрата представляются как защитные реакции микроорганизма к токсическому воздействию стероидов.

Как показали опыты Чапека, Ганч и Малиновой [21а, 22], стероиды угнетают дыхание микроорганизмов, а продукты превращения такого действия не оказывают. Авторы изучили влияние прогестерона и 11α-оксипрогестерона на активность поглощения кислорода клетками мицелия *Rhizopus nigricans*, дегидроэпиандростерона и Δ^4 — андростен-3,17-диона клетками *Actinomyces globisporum*, Δ^4 — андростен-3,17-диона и тестостерона у *Saccharomyces cerevisiae*. Во всех случаях отмечено, что превращаемый субстрат угнетает дыхание, а продукт превращения такого действия не оказывает.

Процессы биосинтеза микроорганизмами антибиотиков, ферментов, витаминов и других метаболитов обычно характеризуются полным использованием исходного субстрата, более или менее обильным ростом мицелия и, соответственно этому, накоплением в мицелии или культуральной жидкости определенных метаболитов. При трансформации стероидов, в отличие от биосинтеза антибиотиков, к среде, первоначально благоприятной для роста гриба, добавляется раствор токсического для него стероида. При хорошо аэрируемых условиях гриб осуществляет химические изменения определенных звеньев его молекулы, в результате чего стероид обезвреживается. При соответствующих условиях реакция протекает в течение нескольких часов с большим (до 85—90%) выходом трансформированного вещества. Отмечено, что трансформируемый стероид обычно адсорбируется клетками мицелия гриба, изменяется выделяемыми ферментами. Превращенные вещества содержатся преимущественно в культуральной жидкости [72].

Процесс трансформации происходит, как правило, в две фазы — обильного роста гриба на полноценной питательной среде (24—72 *час* для грибов) и последующего использования мицелия для воздействия на стероиды. Последние вносят в виде спиртовых, ацетоновых, метаноловых растворов обычно в концентрации от 200—800 *мг* до 4 *г/л*. Продолжительность второй фазы — 12—72 *час* в зависимости от токсичности, растворимости субстрата, густоты и возраста исходной культуры, аэрации и других условий. После отделения мицелия от раствора продукты превращения изолируют прямой их кристаллизацией из раствора (например, при превращении прогестерола *Rhizopus nigricans* в 11α-оксипрогесрол) или путем экстракции, дальнейшего хроматографического, химического и биологического изучения [7, 66].

В зависимости от состава питательной среды, исходного субстрата и штамма гриба процесс трансформации стероидов

может сопровождаться образованием побочных соединений и низким выходом оксипроизводных соответствующих стероидов. Так, при 1—2-гидроксилировании *Rhizopus ferrugena* отмечается гидроксилирование также у C_{11}, C_{15}, восстановление кетогруппы C_{20}, при гидроксилировании *Absidia regnieri, Gliocladium catenulatum* в положении 6β также одновременно образуется несколько продуктов превращения.

Для промышленного получения отдельных кортизонных препаратов может иметь определенное значение и комплексное применение ряда культур микроорганизмов, осуществляющих различные стороны превращения молекулы стероида [7]. В настоящее время регламенты производственного получения стероидных гормонов включают как отдельные этапы технологии микробиологическое их превращение, которое заменяет дорогостоящие и трудно удающиеся химические реакции.

Изучены ферментные системы некоторых видов микроорганизмов, осуществляющих превращение стероидов. Так, выделены в очищенном и кристаллическом виде и изучены ферменты *Pseudomonas testosteroni* [67], некоторых видов актиномицетов и грибов [52, 65, 66].

Зече [77] при изучении гидроксилирования стероидов разными видами *Curvularia* установил, что в культуральной среде при ферментации стероидов не содержится стероидных гидроксилаз. Автор считает, что активная роль в гидроксилировании стероидов этими грибами принадлежит флавиновым ферментам, катализирующим переход молекулярного кислорода на молекулу стероида. Окисление стероидов микроорганизмами осуществляется комплексом ферментных кислородактивирующих систем, стероидактивирующих, систем промежуточного окисления и др. Гидроксилирование стероидов происходит при участии кислорода воздуха [52, 65, 66].

Наряду с изучением превращения стероидов значительное число исследований посвящено трансформации сердечных гликозидов, относящихся также к группе стероидных соединений и применяющихся в медицине при лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

Молекула собственно гликозида состоит из единицы углевода (сахара) соединенного гликозидной связью со спиртами неуглеводной природы. Последние обладают лечебными свойствами (см. кверцетин, рутин) и носят название аглюконов (несахара).

Получение более эффективных новых препаратов или производных природных сердечных гликозидов химическим путем также весьма сложно. Отдельные виды грибов способны производить специфические изменения в молекуле определенных сердечных гликозидов с образованием новых производных, обладающих биологической активностью.

Специфическое превращение дигитоксигенина в дигоксигенин и другие производные осуществляется, например, при использовании *Fus. oxysporum* f. *lini*. Гублер, Тамм [35, 36] показали, что этот гриб (*Fus. lini*) обладает широким комплексом ферментов, вызывающих превращение сердечных гликозидов: 12β и 15α-гидролаз, эстераз, (осуществляющих омыление ацетильных групп), гидрогеназ, β-гликозидаз и др.

Нава и др. [49] установили, что *Fusarium moniliforme, Cunninghamella blakesleeana, Helicostylim piriforme* превращают

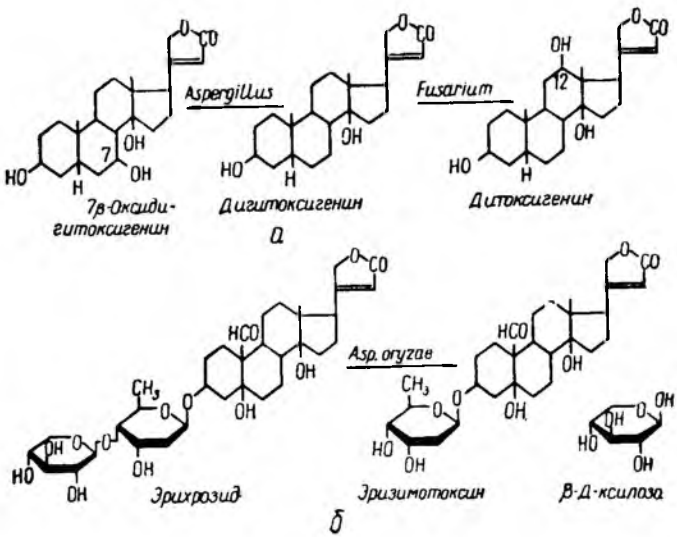


Рис. 54. Превращение сердечных гликозидов видами *Fusarium* и *Aspergillus* (по Гвоздяку):

а — образование из дигитоксигенина 7β-оксидигитоксигенина (слева) и дитоксигенина (справа); *б* — ферментативное расщепление эритрозида *Aspergillus oryzae* с образованием β- и d-ксилозы.

дигитоксигенин в дитоксигенин, дигоксигенин и образуют еще другие ценные производные. *Trichothecium roseum* превращает дигитоксигенин в новые сердечные агликоны — сармонтогенин, Δ^{16} ангидродигитоксигенин и биологически неактивный агликон-6-гидроксидигитоксигенин.

В опытах Гвоздяка [3, 3а], изучавшего характер превращений сердечных гликозидов и аглюконов, вызываемых разными видами *Aspergillus* и *Fusarium* и концентрированным ферментом из *Asp. oryzae,* испытано 24 штамма 18 видов аспергиллов и 27 штаммов пяти видов фузариев.

Грибы выращивали на среде Чапека с конваллозидом (50 *мл* 0,2% в 70%-ном этаноле на 1 *л* среды), дигитоксигенином (50 *мг* в 10 *мл* ацетона на 1 *л* среды). Установлено, что

изучаемые грибы отличаются незначительной активностью гидролиза дигитоксигенина и конваллозида, неодинаковой для отдельных видов и штаммов. Путем многократного пересева на среду, содержащую исследуемые гликозиды, автору удалось повысить их активность, но при посеве на полноценную среду активность гидролиза вновь падала.

Более активными в опытах автора оказались штаммы аспергиллов: фузарии гидролизовали сердечные гликозиды медленнее. Преобладающим веществом при трансформации дигитоксигенина фузариями являлся 12β-оксидигитоксигенин (дитоксигенин), а аспергиллами — 7β-оксидигитоксигенин и другое соединение, по предположению автора — 3-дегидродигитоксигенин. С использованием *Fusarium solani* 217 из дигитоксигенина был получен дигоксигенин с выходом более 60%. Неочищенный концентрат фермента *Asp. oryzae* отщеплял от молекул сердечных глюкозидов β-d-глюкозу и β-d-ксилозу (рис. 54, табл. 58, 59).

Таблица 58

Превращение дигитоксигенина (Д) грибами рода *Aspergillus*

Гриб	Штамм	Д	12 β-Д	7β-Д	3-дегидро-Д	Количество других карденолидов
A. amstelodami . .	642	++		+++	++	1
A. awamory . . .	673	+		+++	+	2
A. clavatus	235	+		++	++	2
A. flavus	237	+	+	+++	+	2
A. fumigatus . .	20021	+	+	++	+	1
» »	10625	++		++	+	3
» »	10130	+		++	+	2
A. nidulans . . .	578	+		++	++	3
A. niger	228	+	±	+++	±	2
» »	10533	+		+++	+	2
A. oryzae	158	++		++	+	3
» »	476	+ +	±	++++	++	2
A. repens	20157	+	+	++	+	1
A. sclerotiorum . .	10456	++		++	+	1
A. sulphureus . .	6127	+		+++	+	2
A. Sydowii . . .	602	+		++	++	1
A. tamari	668	+		+++	+	2
A. terreus	279	±	+	++++	+	2
» »	10132	+		++++	++	3
A. terricola . . .	608	+		+++	++	1
A. versicolor . . .	701	+		+++	+	2
» »	7667	++		++	+	2
A. ustus	56751	++		++	++	1
A. Wentii	20164	+		+++	±	3
Контроль		++++				

Таблица 59

Превращение дигитоксигенина (Д) грибами рода *Fusarium*

Гриб	Штамм	Д	12 β-Д	7 β-Д	Количество других карденолидов
F. avenaceum	1055	±	++++	±	1
F. moniliforme . . .	12828	+	++		2
« «	51135	+	+++		1
« «	51556	±	+++		2
« «	51796	+	+++		1
« «	51799	++	++		1
F. oxysporum	541	++	++		
« «	1095	++	+++		
« «	7264	+	+++	±	
« «	8486	++	++		1
« «	51275	+	+++	±	1
« «	51797	+	+++		
F. solani	122	+	+++		1
« «	217	±	++++		1
« «	2729	+	++		2
« «	2942	+	++		1
« «	51116	+	++		1
« «	11712	++	++		1
« «	51776	+	+++		1
F. sporotrichiella . .	1694	±	+++	±	1
« «	5162	+	++		2
« «	11531	+	+++		
« «	51495	++	++		2
« «	51555	+	+++		1
« «	51950	++	++		
« «	51951	++	++		1
« «	51952	+	+++		1
		++++			

Автор считает, что изученные виды грибов и фермент *Asp. oryzae* могут быть использованы для получения производных сердечных гликозидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байчиков А., Барменков А., Ерошин В., Биосинтез стероидов с помощью микроорганизмов.— Мед. пром. СССР, 1959, **13**, 15.

2. Барменков А., Балашева Е. Биологическое превращение 16α-, -17α-оксидопрогестерона с помощью гриба *Rhizopus nigricans*.— Мед. пром. СССР, 1962, 7, 45.

3. Гвоздяк П. Микробиологические превращения дигитоксигенина.— Мед. пром. СССР, 1963, **11**, 26.

3а. Гвоздяк П. Микробиологическое превращение сердечных гликозидов. Автореф. канд. дисс. К., 1964.

4. Ерошин В. Стероидные гормоны.— Природа, 1961, 3.

4а. Ерошин В., Красильников Н. Селективное микробиологическое окисление II оксигруппы гидрокортизона.— ДАН СССР, 1961, **137**, 968.

5. Ерошин В. Способность грибов Mucorales окислять стероид «S».— Микробиология, 1962, **31**, 608.

6. Ерошин В. Превращение вещества Рейхштейна грибами Absidieae.— Мед. пром. СССР, 1962, **11**, 23.

7. Коган Л. Микробиологические превращения стероидов.— Усп. химии, 1962, **31**, 581.

8. Красильников Н. и др. Трансформация кортизона в преднизолон при помощи *Mycobacter* sp. № 193.— ДАН СССР, 1959, **128**, 1063.

9. Суворов Н. К вопросу промышленного синтеза кортизона.— Мед. пром. СССР, 1956, **10**, 22.

10. Суворов Н. Новые гормоны.— Хим. наука и пром., 1956, **1**, 406.

11. Суворов Н., Ярославцева Л., Соколова И. Синтез кортизона из соласодина.— Мед. пром. СССР, 1958, **12**, 7.

12. Тимофеева А. и др. Гидроксилирование прогестерона при помощи *Rhizopus nigricans*.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1958, **6**, 712.

13. Уоллен Л., Стодола Ф., Джексон Р. Типовые реакции ферментативной химии. ИЛ, М., 1962.

14. Acklin W., Prelog V., Zäch D. Reaktionen mit Mikroorganismen. 2. Die stereospezpezifische Reduktion von $(\pm)=\Delta^{4,9}$-8-Methyl-hexahydroindendion-(1,5).— Helv. chim. acta, 1958, **41**, 1416.

15. Acklin W., Dutting D., Prelog V. Reaktionen mit Mikroorganismen. 3. Reduktion von $(\pm)$,-Δ^4-9-Methyloktalindion, (3,8) mit *Aspergillus niger*.— Helv. chim. acta, 1958, **41**, 1416.

16. Acklin W., Prelog V., Zäch D. Reaktionen mit Mikroorganismen. 4. Die stereospezifische Reduktion von $(\pm)$-9-Methyl-cisdekalindion-(1,6) mit *Rhizopus nigricans*. Die direkte configurative Verknüpfung der auf mikrobiologischem Wege erhaltenen 9-Methyl-dekalin-Derivate mit den Steroiden.— Helv. chim. acta, 1958, **41**, 1416.

17. Asai T. et al. Microbiological hydroxylation of steroids. III. Hydroxylation of progesterone by *Syncephalastum* sp.— J. Gen. a. Appl. Microbiol., 1958, **4**, 79.

18. Asai T. et al. Studies on the hydroxylation of steroid by microorganisms. Pt. II.— Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 1959, **23**, A82.

19. Asai T. et al. Microbiological hydroxylation of progesterone by Rhizopus.— J. Gen. and Appl. Microbiol., 1958, **4**, 63.

20. Blank F., Shortland F., Gust G. The free sterols of dermatophytes.— J. Invest. Dermatol., 1962, **39**, 91.

21. Bocks S., Smith S., Norman R. Hydroxylation of phenoxyacetic scid and anison by *Aspergillus niger* (Van Tiegh.)— Nature, 1964, **201**. 17.

21а. Čapek A., Haně O., Malikova E. Microbialni premeny steroidu. VIII. Vpliv progesteronu na prubeh zakladnich kvasnych krivek u kmene.— Ceskosl. microbiol., 1957, **2**, 28.

22. Čapek A., Pavlů H., Hanč O. Bacterial conversion of steroids. XI. Influence of steroids on bacterial respiration.— Ceskosl. microbiol., 1958, **3**.

23. Čapek A., Pavlů H., Hanč O. Microbielle Umwandlungen der Steroide. XI. Einfluß der Steroide auf die Atmung der Mikroorganismen.— Folia biol. (Ceskosl.), 1958, **4**, 337.

24. Čapek A., Hanč O. Microbiological transformations of steroids. XII. Transformation of steroids by different species and strains of Fusaria.— Folia microbiol., 1960, **5**.

25. Čapek A., Hanč O. Microbiological transformation of steroids. XIV. Microbial II β-hydroxylation of steroids.— Folia microbiol., 1961, **6**, 237.

26. Čapek A. Microbiological transformation of steroids. XV. Transformation of steroids S. (Reichstein) by *Absidia orchidis* 310.— Folia microbiol., 1961, **6**, 392.

27. Čapek A. et al. Microbial transformation of steroids. Dehydrogenation of cortison in position 1—2.— Folia microbiol., 1962, **7**, 175.

28. Capek A., Hanč O. Microbial transformation of steroids. XVII. Transformation of progesterone by various species and strains of Penicillium.— Folia microbiol., 1962, 7, 121.

29. Čapek A., Hanč O., Tarda M. Microbiological transformation of steroids. Microbiological preparation of 1,4-androstadiene derivatives.— Folia microbiol., 1963, 8, 121.

30. Dulaney E., Starley E., Hlavač C. Hydroxylation of steroids, principally progesterone, by a strain of *Aspergillus ochraceuss.*— Mycologia, 1955, **47**, 464.

31. Dulaney E., Starley E. Studies on the transformation of 11-deoxy-17-α-hydroxycorticosterone to hydrocortisone with a strain of *Curvularia lunata.*— Appl. Microbiol., 1959, 7, 276.

32. Eppstein S. et al. Microbiological transformation of steroids and their application to the synthesis of hormones.— Vitamins a. Hormons, 1956, **14**, 353.

33. Eppstein S. et al. Microbiological transformation of steroids. XV, Tertiary hydroxylation of steroids by fungi of the order Mucorales.— J. Amer. Chem. Soc., 1958, **80**, 3382.

34. Fried I. et al. The use of microorganisms in the sinthesis of steroid hormones and hormone analogues.— Rec. Progr. in Horm. Res., 1955, **11**, 149.

35. Gubler A., Tamm C. Umwandlung von Cardenoliden durch Microorganismen: 1.12 β-Hydroxylierung von Digitoxigenum. I. Über Reaktionen mit Mikroorganismen.— Helv. chim. acta, 1958, **41**, 297.

36. Gubler A., Tamm C. Hydroxylierung von Androsten (4)-dion (3.17), Testosteron, Progesteron und Cortexon durch *Fusarium lini* (Bolley). 2. Über Reaktionen mit Mikroorganismen.— Helw. chim. acta, 1958, **41**, 301.

37. Hanč O., Reidl-Tumova E. Die mikrobielle Umwandlung von Steroiden.— Pharmazie, 1954, **9**, 877.

38. Hanč O., Čapek A., Tadra M. Mikrobiologicki premeny steroidu. Priprava kortisolu a kortisonuzc 17a-hydrorykorte xonu s vyuzitum mikrobialm hydroxylace pomoce Absidia orchidis 310.— Ceskosl. farmac., 1962, **11**, 181.

39. Hartman R., Holmland C. Microbial binding of steroids.— Bacteriol. Proc., 1960, 159.

40. Hasegawa T., Takahashi T. Studies on the oxidation of steroids by fungi. I. The steroids oxidizing property of *Corticium sasaki.*— Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 1958, 22, 212.

41. Iizuka H., Naito A., Hattori M. Hydroxylation of progesterone by Aspergillus. I.— Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 1958, **22**, 2.

42. Iizuka H., Naito A., Hattori M. Microbiological hydroxylation of progesterone by Aspergillus. Microbiological hydroxylation of steroids.— J. a. Appl. Microbiol., 1958, **4**, 67.

43. Jefferson W. Jr., Sidoo C. The influence of exogenous steroids on the growth of *Aspergillus niger* and *Torula utilis.*— J. Gen. Physiol., 1961, **44**, 1029.

44. Kluger B., Siebert R., Shubert A. Mikrobielle Oxydation von Steroiden in 15α-Stellung durch Fusarien.— Naturwissenschaften, 1957, **44**, 40.

45. Kurosawa Y. Steroids and microorganisms.— РЖБ, 1960, 6, 24173.— J. Agric. Chem. Soc. Japan, 1958, **32**, 415.

46. Lester G., Hechter O. Effect of deoxycorticosterone on the growth of microorganisms.— J. Bacteriol., 1958, **76**, 365.

47. Levy H., Talalay P. Bacterial oxidation of steroids. I. Ring a dehydrogenations by intact cells.— J. Biol. Chem., 1959, **234**, 2009.

47a. Matkovics B., Sipos G. Über die Wirkung des Engosterins auf das Redoxpotential und den Trockensubstanzgehalt von Penicillinum Chrysogenum G176 Kulturen.— Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 1959, **9**, 347.

48. Meister P. et al. Microbiological transformation of steroids. II. The preparation of 11 α-hydroxy-17 α-progesterone.— J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 55, 416; 1954, **76**, 4050, 5679.

49. Nawa H. et al. Microbiological teransformation of a cardiac aglycone.— Nature, 1959, **184**, 469.
50. Peterson D., Murray H. Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11.— J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 1871.
51. Peterson D. Microbiological transformation of steroids and their application to the synthesis of hormones.— The IVth Int. Congr. Biochem., 1958, **4**, 83.
52. Peterson D. Microbial transformations of steroids and their application to the preparation of hormones and derivatives.— In: Biochem. of Ind. Microorganisms. Ed. C. Reinbow, A. Rose. Acad. Press, London—New York, 1963.
53. Rao P. Microbiological hydroxylation of testosterone by *Circinella muscae* (Sor) Berl. et de Toni.— Indian J. Chem., 1963, **1**, 314.
54. Rao P. Microbiological transformation of steroids with *Fusarium roseum*.— Indian J. Pharm., 1963, **25**, 131.
55. Resser F., Koipsell H., Savage G., Continuous microbiological transformation of steroids.— Appl. Microbiol., 1961, **9**, 346.
56. Sato I., Hayakawa S. Microbiological hydroxylation of steroidal alkaloids.— J. Org. Chem., 1961, **26**, 4181.
57. Schatz A., Savard K., Pintner I. The ability of soil microorganisms to decompose steroids.— J. Bacteriol., 1949, **58**, 117.
58. Schleg M., Knight S. Hydroxylation of progesterone by conidia from *Aspergillus ochraceus*.— Mycologia, 1962, **54**, 317.
58a. Sebek O., Reineke L., Peterson D. Intermediates in the metabolism of steroids by *Penicillium lilacinum*.— J. Bacteriol., 1962, **83**, 1327.
59. Schuytema E. et al. Transformation of progesterone by basidiomycetes.— Appl. Microbiol., 1963, **11**, 256.
60. Shirasaka M., Tsuruta, Nakamura, Microbiological hydroxylation of Reichstein's compound S/17-a-hydroxydeoxycorticosterone by *Sclerotinia* sp. 2β-hydorxylation.— Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 1958, **22**, 244; 273.
61. Shirasaka M., Ozaki M., Sugawava S. Studies on microbiological transformation of steroid compounds.— J. Gen. Appl. Microbiol., 1961, Suppl., 341.
62. Shubert A. et al. Mikrobielle Hydroxylierung von Progesteron in 6- und 14-Stellung.— Zs. Naturforsch., 1960, **15b**, 269.
63. Shull G. Transformation of steroids by molds.— Trans. N. Y. Acad. Sci., 1956, **19**, 147.
64. Spalla C., Amici A., Bianchi M. Studies on the microbiological oxidation of Reichstein's compounds S by *Cunninghamella blakesleeanus* Lendner.— J. Microbiol., 1961, **9**, 255.
65. Stodola F. Chemical transformation by microorganisms. E. Squib lectures on chemistry of microbial products. Rutgers Inst. Microbiol., New Jersey, 1958.
66. Stoudt T. The microbiological transformation of steroids.— Adv. in Appl. Microbiol., 1959, **2**, 183.
67. Talalay P. Enzymatic mechanisms in steroids metabolism.— Physiol. Rev., 1957, **37**, 362.
68. Tamm C. Microbiologische Umwandlungen von Steroiden und weiteren Naturstoffen.— Planta medica, 1960, **8**, 331.
69. Titus E., Murray A., Spiegel H. Production of a new cardiac aglycone by microbiological hydroxylation of digitoxigenine.— J. Biol. Chem., 1960, **235**, 3399.
70. Turfitt G. Microbiological agencies in the degradation of steroids.— J. Bacteriol., 1947, **47**, 487.
71. Vezina C., Sehgal S. Transformation of progesterone by conidia of *Aspergillus ochraceus*.— Appl. Microbiol., 1963, **11**, 50.
72. Vischer E., Wettstein A. Enzymic transformation of steroids by microorganisms.— Adv. Enzymol. a. Related Subjects, Biochem., 1958, **20**, 237.
73. Wallen L., Stodola F., Jackson R. Type reactions in fermentation chemistry. U. S. Dept. Agric., New York, 1959.

74. Weaver E., Kenney H., Wall M. Effect of concentration on the microbiological hydroxylation of progesterone.— Appl. Microbiol., 1960, 8, 345.
75. Wettstein A. Conversion of steroids by microorganisms.— Experientia, 1955, 11, 465.
76. Wix G., Weisz E., Bodanszky A. Verwandlung des progesterons in 11-Epicorticosteron mit Hilfe von *Aspergillus niger*.— Acta microbiol. Acad. sci. Hung., 1957, 4, 9.
77. Zetshe. Chemisch-Physiologische Untersuchungen über die Hydroxylierung von Steroiden durch Pilze der gattung *Curvularia*.— Arch. Microbiol., 1961. 38, 237.

ПРЕВРАЩЕНИЯ ФЕНОЛОВ, УГЛЕВОДОРОДОВ И ДРУГИХ СЛОЖНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Фенолы и другие ароматического строения соединения широко распространены в растениях, где они образуются как промежуточные продукты превращения сахаров в ароматические соединения. Хинная кислота, например, входит в состав дубильных веществ плодов и других частей растений. Окисляясь, она может превращаться в ряд дегидропроизводных; из нее образуется гидрохинон. Изомером гидрохинона является пирокатехин (гваяковая смола).

К распространенным в растениях представителям ароматических соединений относятся также флороглюцин, пирогаллол. При окислении фенолы образуют различные хиноны, кислоты, альдегиды, которые также распространены в растениях. Разложение растительных остатков или поражение растений грибами на определенных фазах связано с использованием этих соединений. В связи с этим исследования по превращению фенолов и их производных касаются способности почвенных грибов усваивать фенолы, влияния фенолов и продуктов их окисления на фитопатогенные грибы и устойчивость растения к заболеванию, биосинтеза фенолов отдельными видами грибов, химизма превращений и др.

Хайдерсон, Фармер [48—52] показали, что многие виды почвенных микроскопических грибов способны усваивать ароматические соединения как единственные источники углерода.

В опытах авторов первоначальное выделение грибов, усваивающих ароматические соединения, проведено путем посева различных образцов почвы на минеральную среду, содержащую таннииновую кислоту (0,1%). Затем выделенные на этой среде грибы испытывались в отношении способности их роста на средах с п-гидроксибензальдегидом, альдегидом сиреневой кислоты, ваниллином (в концентрации 0,01%) и феруловой кислотой (в концентрации 0,005%) как единственными источниками углерода. Определение продуктов превращения этих веществ производилось спектрографически и хроматографически, после 21-дневного их роста.

Наиболее активными оказались *Alternaria sp., Aspergillus* sp., *Chaethomella* sp., *Coniothyrium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Hormiscium* sp., *Hormodendron* sp., *Penicillium* sp., *Pyrenochaeta* sp., *Sphaeronema* sp., *Torula* sp. Эти грибы вызывали полное разрушение бензольного кольца всех испытанных соединений. Интенсивность разложения изучаемых субстратов была разная — наиболее быстро большинством грибов разлагался *n*-гидроксибензальдегид, затем ванилин. Альдегид сиреневой кислоты в значительной степени разрушался штаммами родов *Aspergillus, Botrytis, Cephalosporium, Haplographium,* большинством *Penicillium, Trichoderma, Verticillium.* Одни виды грибов накапливают в среде промежуточные продукты, при росте других их не обнаружено. Ферруловая кислота и ванилин превращаются в ванилловую кислоту, альдегид сиреневой кислоты — в сиреневую кислоту.

Отдельные виды почвенных микромицетов способны усваивать метоксилированные ароматические соединения. Опыты были проведены с использованием грибной пленки *Haplographium* sp., *Hormodendron* sp., *Penicillium* sp., выращенных на минерально-глюкозной среде с дрожжевым экстрактом. Под промытую дистиллированной водой пленку при pH 6,5 вводился 0,1%-ный раствор орто-, мета- или пара-монометоксибензойной кислоты и через 14 дней раствор анализировался. Результаты опытов показали, что пара-метоксибензойная кислота разрушалась быстрее чем мета- и орто-соединения. Поглощение кислорода грибами при росте на этих соединениях также было значительно ниже.

Хроматографическим изучением и спектрохимическим анализом было установлено, что при разложении метоксибензойных кислот образуются соответствующие гидроксибензойные кислоты, а штаммы *Penicillium* образуют из пара-метоксибензойной кислоты пара-метоксифенол.

В дальнейшем образованная пара-гидроксибензойная кислота превращается грибами *Hormodendron* sp., *Penicillium* sp. и другими в протокатехиновую кислоту; вератровая кислота (3,4-диметоксибензойная кислота) — в ванилловую кислоту (рис. 55).

Автор считает, что реакция деметилирования ароматических соединений изученными видами почвенных грибов может иметь место в процессах разложения в почве лигнинсодержащих растительных остатков.

Микроэлементы — медь, железо, марганец и цинк — оказывают влияние на метаболизм грибами фенолов и их производных. Положительное влияние на метаболизм ароматических соединений имеет железо. У всех грибов при использовании мицелия, выращенного на среде без железа, интенсивность усвоения и образования промежуточных продуктов была значитель-

но ниже, чем при использовании мицелия, выращенного на среде с железом. В качестве промежуточных продуктов отмечены протокатехиновая кислота при метаболизме м- и п-гидроксибензойной и п-метоксибензойной кислоты; катехол — изогидроксибензойной; ванилловая кислота — из 3,4-диметоксибензойной; орто-, моно- и пара-гидроксибензойные кислоты — из соответствующих моно-метоксибензойных кислот.

Как видно из приведенных ниже данных, усвоение о-гидроксибензойной кислоты и соответственно этому образование

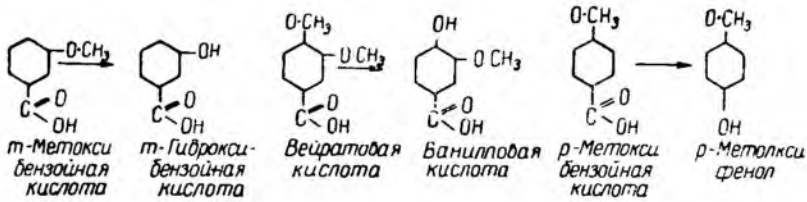


Рис. 55. Некоторые превращения метоксилированных ароматических соединений при их метаболизме почвенными грибами (по Henderson).

катехола у *Asp. niger* происходит значительно интенсивнее в мицелии культуры, предварительно выращенной на полноценной среде с железом. Мицелий *Hormodendron* sp., росший предварительно на среде без железа, не метаболизирует протокатехиновую кислоту при усвоении мета- и особенно парагидроксибензойной кислоты (табл. 60, 61).

Таблица 60

Метаболизм о-гидроксибензойной кислоты и образование катехола в погруженной культуре мицелием *Asp. niger*, росшим на среде с железом (+) и на среде без железа (—) *

Дни	Остаточная о-гидроксибензойная кислота, *мг* на 25 *мл*		Катехол, *мг* на 25 *мл*	
	+	—	—	—
1	8,5	17,7	5,8	2,0
2	0,04	12,9	0,02	1,8
3	0,04	7,2	0,02	1,7

* Пленка гриба инкубировалась с 25 *мл* 0,01 М раствором о-гидроксибензойной кислоты при 26° С. Остаточные кислоты и катехол экстрагировались эфиром из раствора и определялись адсорбцией в УФ при 295 и 280 *ммк* соответственно.

Известна способность *Asp. niger, Pen. glaucum* и других грибов разлагать таннины с образованием в среде галловой кислоты. Эти грибы используются для получения последней из

Таблица 61

Накопление протокатехиновой кислоты при усвоении м- и п-гидроксибензойной кислоты мицелием *Hormodendron* sp., росшим на среде с железом (+) и без железа (—) *

Дни	*мг* протокатехиновой кислоты (25 *мл*)			
	+Fe		—Fe	
	м-гидроксибензойная кислота	п-гидроксибензойная кислота	м-гидроксибензойная кислота	п-гидроксибензойная кислота
2-й	30	90	60	240
5-й	0	0	10	680
8-й	0	0	40	420

* Пленка гриба инкубировалась с 0,01 М раствором мета- и парабензойной кислот. Остаточные количества в растворе из эфирного экстракта определены количественно бумажной хроматографией, а экстракт—адсорбцией в УФ при 293 *ммк*

экстрактов «галловых орешков». Представители этих двух родов грибов в довольно высокой концентрации (до 25%) в среде могут использовать таннин в качестве источника углерода.

Фридрих [46] изучал разложение *Asp. niger* галлотаннина и фенольных веществ, содержащихся в экстрактах «галловых орешков» с помощью хроматографии. В опытах автора гриб выращивался на минеральной среде с микроэлементами и 0,5% галлотаннина как источника углерода. Хроматографическое изучение культуральной жидкости в трех-, четырех- и девятидневном возрасте культуры гриба при поверхностном росте показало, что расщепление галлотаннина наступает уже через три дня. В культуральной жидкости наряду с галловой кислотой отмечаются другие фенольные вещества. Через шесть дней отмечена только галловая кислота, а через девять эти субстраты были полностью использованы грибом. При росте гриба на средах с различной концентрацией галловой кислоты последняя исчезает также к девятидневному росту гриба (рис. 56). Гриб использует также пирогалловую кислоту (0,5 и 1,0%), ризорцин, гидрохинон (0,5%), хроматографически изучены продукты разложения этих субстратов. В качестве промежуточных продуктов хроматографически на 5-й день роста обнаружено при росте на гидрохиноне и гидрохиноле вещество по Rf, совпадающее с 2,4 динитрофенилгидрозаном левулиновой кислоты.

Уиллс [77] определил, что *Penicillium* sp., выделенные из толданского бальзама, используют бензойную и коричную кислоты в качестве источников углерода.

Мэдгозинг [61] установил способность распространенного в почве гриба *Fus. oxysporum* превращать 2,4-динитрофенол в ряд соединений, не обладающих токсическими свойствами: гриб

восстанавливает это соединение с образованием 2-амино-4-нитрофенола и 4-амино-2-нитрофенола, которые также метаболизируются грибом.

Наиболее активно процесс проходит до 20-дневного возраста культуры, при pH 7,1. При обработке гриба препаратом 2-амино-4-нитрофенола в среде обнаруживается 2,4-нитрофенол.

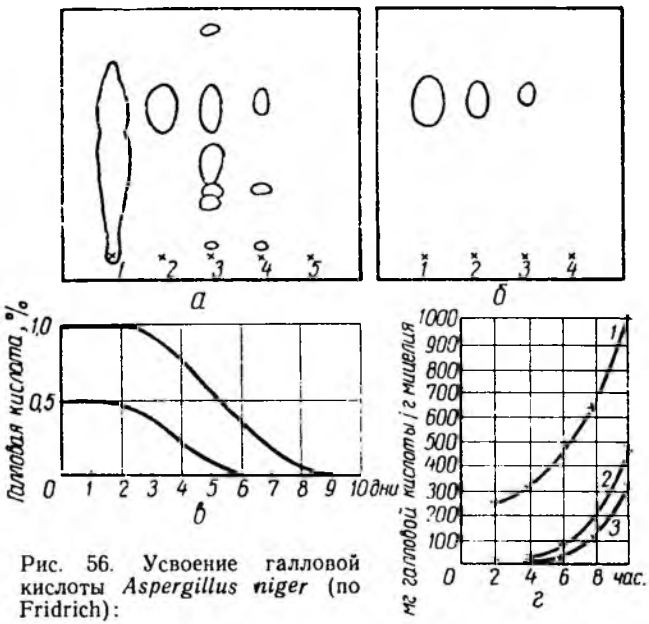


Рис. 56. Усвоение галловой кислоты *Aspergillus niger* (по Fridrich):

а — разложение галлотаннна *Aspergillus niger: 1* — незасеянная галлотаниновая жидкость; *2* — раствор галловой кислоты; растворы галлотанина после трехдневного роста гриба (*3*), четырехдневного (*4*) и девятидневного (*5*); *б* — потребление галловой кислоты *Aspergillus niger*. Растворы галловой кислоты: *1* — незасеянный, *2* — трехдневного роста гриба, *3* — шестидневного, *4* — девятидневного; *в* — потребление галловой кислоты *Aspergillus niger* в течение 10 дней при различной ее концентрации в среде; *г* — активность танназы *Aspergillus niger* на средах с разными источниками азота (по Lippitsh): *1* — гидролизат казеина; *2* — $(NH_4)_2SO_4$; *3* — KNO_3.

Присутствие последнего автор объясняет наличием обратимой нитратредуцирующей ферментной системы.

Влияние ряда фенольных соединений на рост отдельных видов фитопатогенных грибов изучалось в связи с выяснением механизма устойчивости растений к вызываемым ими заболеваниям. Продукты окисления фенолов, как и фенолы, обладают токсическими свойствами для многих видов фитопатогенных грибов.

Фенолы активно изменяют направленность окислительно-восстановительных процессов в растении. Обладая способ-

ностью вступать в соединение с белками, они вызывают их денатурацию, а также влияют на физико-химические свойства белков клетки, инактивируют отдельные ферменты, образуют ряд физиологически активных продуктов их окисления. Образуемые при окислении фенолов хиноны также играют важную роль в окислительных процессах растительных организмов.

Рядом авторов отмечено, что устойчивость растений к определенным заболеваниям связана с присутствием в них различных фенольных соединений. Наличие в цветных клетках луковиц протокатехиновой кислоты и катехола делает их более устойчивыми к поражению *Colletotrichium circinans, Botrytis allii;* наличие хлорогеновой и кофейной кислот в клубнях картофеля и 2,3-бензоксазолина в сеянцах ржи повышает их устойчивость к поражению грибами [69, 75 и др.].

Валле [74] установил антигрибное действие хлорогеновой и кофейной кислот, находящихся в листьях картофеля, на *Fusarium nivale, Phytophtora infestans.* Увеличение общего содержания фенолов в тканях хлопчатника, картофеля, по данным ряда авторов, наоборот, связано с чувствительностью к вилту, раку.

По мнению Дэвиц, Вэгоннер, Даймон [41], фенолы вызывают изменение окраски сосудов у помидоров, зараженных *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici.* Окрашенные вещества являются продуктами окисления свободных фенолов фенолоксидазами, а свободные фенолы в растениях образуются из связанных под воздействием гидролитических ферментов гриба.

Мак Ки [58] в опытах in vitro установлена различная чувствительность конидий разных видов фитопатогенных грибов к алкалоидам растений. Задержка прорастания конидий наступала при концентрации от 5 до 30—33 и 500 *мг/л* для многих видов фузариев. При токсической концентрации соланион разрушает клеточные оболочки конидий, уплотняет их содержимое. Зооспоры *Phytophora infestans* увеличиваются в размерах и распадаются на отдельные части. Такое же фунгистатическое действие проявляли алкалоиды демиссин, томатин, коканин.

Тоурно, Мк Лин, Гутрье [73] изучили влияние 13 фенолов и фенольных кислот и четырех хинонов на *Verticillium alboatrum* — возбудителя увядания картофеля. В опытах авторов гриб культивировался на среде Чапека с сахарозой и добавлением микроэлементов (молибдена и марганца 0,02 *мг,* меди и цинка — 0,1 *мг,* железа — 0,2 *мг;* марганец, медь и цинк добавлялись в виде сульфатов; железо — соли азотной кислоты; молибден — молибдата натрия). Влияние изучаемых веществ на рост гриба определялось при выращивании его в жидкой среде и на агаре, при определении, соответственно, веса мицелия и степени задержки роста колонии.

Испытаны: катехол в концентрации 50, 100, 150 *мг*%, резорцинол, гидрохинон — 10^{-3}; пирогаллол — 5×10 M^{-5}; 2,3-дихлоро-1,4-нафтохинон в концентрации 10^{-6} и $7\cdot10^{-7}$ М. Пирогаллол и катехол в наибольшей степени снижали рост гриба. Хиноны были более токсичны, чем фенолы.

Влияние фенолов на рост мицелия гриба *Cochlioides miyabeans*, вызывающего пятнистость листьев риса, и значение фенолоксидазных ферментов гриба в фунгистатическом действии полифенолов изучал Оку [66]. Рост *Cochlioides miyabeans* тормозился различными полифенолами, имеющими в структуре О-дифенолы. Катехол в концентрации 3×10^{-3} полностью задерживал рост гриба на минерально-сахарозной среде Чапека с пигментацией среды в коричневый цвет. Токсичность катехола для мицелия гриба снималась добавлением в среду диэтилдитиокарбамата, ингибитора медьсодержащих ферментов (полифенолооксидазы) (табл. 62). Снижалось его токсическое

Таблица 62

Влияние Na-диэтилдитиокарбамата (ДДК) на токсичность катехола для мицелия *Cochlioides miyabeans*

Концентрация ДДК(М)	Концентрация катехола (М)					
	0		3×10^{-3}		10^{-3}	
	Диаметр колонии, *мм*	Пигментация среды	Диаметр колонии, *мм*	Пигментация среды	Диаметр колонии, *мм*	Пигментация среды
0	48	—	±	+++	12	+
2×10^{-2}	0	—	0	—	0	—
10^{-2}	14	—	19	—	18	—
5×10^{-3}	17	—	21	—	23	—
$2{,}5\times10^{-3}$	19	—	4	—	22	—
$1{,}25\times10^{-3}$	22	—	+	+++	18	—
6×10^{-4}	24	—	±	+++	16	±

действие на прорастание гриба и добавлением биологически редуцирующих веществ — аскорбиновой кислоты или глютатиона (табл. 63). Токсичность меланиноподобного коричневого вещества, образующегося в среде при окислении катехола полифенолоксидазой гриба, не снималась добавлением аскорбиновой кислоты, наоборот, эти продукты окисления катехола обладали большей токсичностью для гриба, чем катехол. Автор считает, что фунгицидное действие полифенолов на *Cochlioides miyabeans* обусловлено продуктами окисления их полифенолоксидазой гриба.

По данным Рубина и Арцыховской, различия в содержании дубильных веществ в листьях чувствительных и устойчивых к

Таблица 63

Влияние аскорбиновой кислоты и глютатиона на угнетение катехолом спорообразования *Cochlioides miyabeans**

Вещества	Концентрация катехола (М)			
	0	3×10^{-3}	10^{-3}	3×10^{-4}
Катехол	79,6	5,3	11,5	18,3
Катехол + аскорбиновая кислота (1 : 1)	79,6	38,6	78,8	92,8
Аскорбиновая кислота	79,9	94,0	96,5	96,5
Катехол + глютатион (1 : 1)	79,6	81,0	77,4	68,3
Глютатион	79,6	85,2	81,2	89,7

* Данные приведены в процентах спорообразования.

Ph. infestans сортов картофеля отмечаются не по общему содержанию фенолов, а по содержанию определенных, подвижных, растворимых их фракций: у восприимчивых сортов до 80% дубильных веществ в листьях составляют малоподвижные таннины. Хлорогеновая кислота ингибирует процессы фосфорилирования, обладает антигрибными свойствами [18, 21].

Рубин и Арцыховская [21—23 и др.] считают, что токсичность фенолов для растения зависит от их способности к окислению и усилению, в связи с этим, окислительных процессов в растении.

Окисление фенолов осуществляется комплексом медьсодержащих ферментов полифенолоксидаз, среди которых различают тирозиназу, окисляющую преимущественно монофенолы и полифенолы до образования темноокрашенных продуктов — меланинов, и лакказу, окисляющую преимущественно полифенолы. Полифенолоксидазы распространены у высших базидиальных, особенно древоразрушающих грибов, а также многих видов гифальных грибов.

Рубин и Иванова [20] изучили дегидрогеназный комплекс гриба *Botrytis cinerea* при культивировании на жидком капустном отваре с 1% сахарозы. В качестве окисленных фенолов капусты авторами использованы продукты ферментативного окисления флороглюцина. В вытяжках из мицелия и в ацетоновых препаратах авторами установлено наличие трех групп дегидрогеназ: 1) осуществляющие перенос водорода без наличия коферментов, 2) связанные с ДПН и 3) связанные с ТПН (наиболее активная группа). Продукты окисления флороглюцина подавляют активность дегидрогеназ гриба, особенно в молодом возрасте гриба. При этом наиболее чувствительны к

воздействию продуктов окисления флороглюцина дегидрогеназы, катализирующие перенос водорода без участия пиридиннуклеотидов. Торможение активности этих дегидрогеназ продуктами окисления флороглюцина, по мнению авторов, имеет существенное влияние на дыхание мицелия гриба, его рост и локализацию в некротических пятнах пораженных листьев капусты.

Матта и Даймонд [62] полагают, что в заболевании томатов фузариозным увяданием имеет значение степень развития мицелия гриба и его ферментативная активность. В частности, по данным опытов, активность полифенолоксидазы и пектинметилэстеразы в стеблях больных растений значительно (в 9—10 раз) повышалась. Побурение сосудов наступало при наибольшей активности полифенолоксидазы, что авторы связывают с возможным действием хинонов и продуктов их полимеризации. Не отмечено разницы в активности полиметилэстеразы в тканях корня больных и здоровых растений.

Губанов и Бредихина [9] установили способность грибов *Fus. oxysporum* f. *vasinfectum (Fus. vasinfectum* В. Б.) и *Verticillium dahliae* — возбудителей увядания хлопчатника — метаболизировать различные фенолы и гликозиды. В их опытах грибы хорошо росли на средах с гидрохиноном, пирогаллолом, таннином, амигдалином. Трудно усваивались резорцин, салициловая и галловая кислоты.

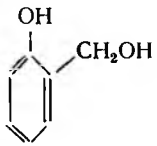
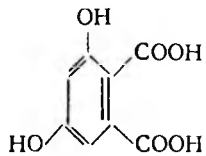
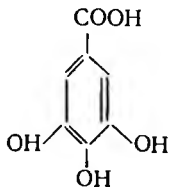
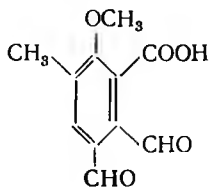
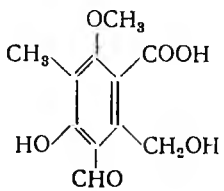
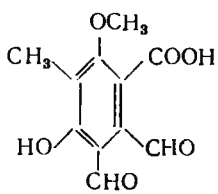
Многие виды грибов в процессе метаболизма способны образовывать ароматические соединения и нередко накоплять их в значительном количестве в культуральной жидкости или мицелии (табл. 64).

Кохрэйн (1958) относит образуемые грибами ароматического строения соединения к следующим группам: замещенные бензолов, замещенные бензохинонов, антрахиноны, производные хризофановой кислоты, ксантоны, нафтохиноны, производные тропалона, депсиды, депсидоны. В зависимости от возраста культуры, условий роста один вид гриба может образовывать различные производные соединений ароматического строения. Например, биосинтез патулина *Penicillium urticea* в зависимости от концентрации железа и цинка в среде может сопровождаться образованием гентизилового спирта или смеси патулина, 6-метилсалицилловой кислоты и толухинона.

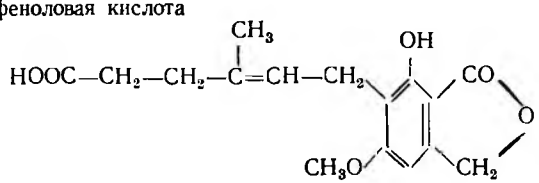
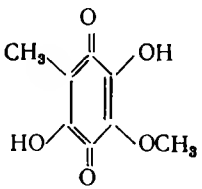
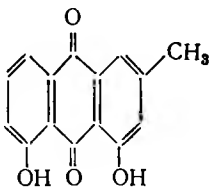
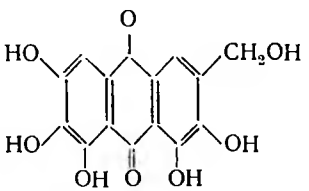
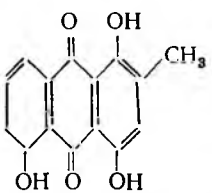
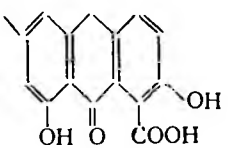
Боковая цепь фенилуксусной кислоты окисляется *Pen. chrysogenum* в бензойную кислоту с образованием в качестве промежуточного продукта бензойного альдегида. Бензойная кислота отмечена в культурах *Pen. roseo-purpurogenum*. Мутанты *Neurospora crassa* окисляют протокатехиновую кислоту с образованием β-кетоадиновой кислоты. У многих видов грибов в процессе метаболизма образуются одновременно фенолы и хиноны и другие гидроксипроизводные.

Таблица 64

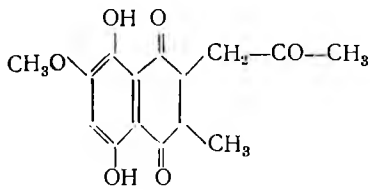
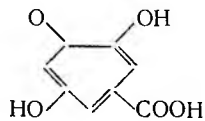
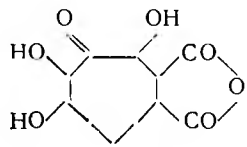
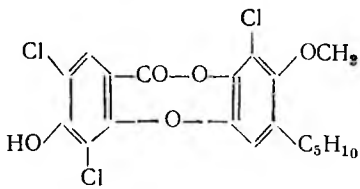
Некоторые ароматические соединения—метаболиты разных видов грибов (по Кохрэйн, 1958)

Вещество и строение	Вид гриба-продуцента
Гентизиловый спирт 	*Penicillium* sp.
3,5-дигидроксифталевая кислота 	*Pen. brevicompactum*
Галловая кислота 	*Phycomyces blakesleeanus*
Гладнолювая кислота 	*Pen. gladioli*
Циклопиевая кислота 	*Pen. cyclopium*
Циклопалдиевая кислота 	» »

Продолжение табл. 64

Вещество и строение	Вид гриба-продуцента
Микофеноловая кислота 	*Penicillium* sp.
Спинулозин 	*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp.
Хризофановая кислота 	*Pen. islandicum*
Аспертецин 	*Asp. quadrilineatus*
Ривелин 	*Helminthosporium ravelii*
Пинселовая кислота 	*Pen. amarum*

Продолжение табл. 64

Вещество и строение	Вид гриба-продуцента
Яваницин 	*Fusarium javanicum*
Стипитановая кислота 	*Pen. stipitatum*
Пуберуловая кислота 	*Pen. puberulum*
Нидулин 	*Asp. nidulans*

Изучению биосинтеза фенолов и углеводородов (каротинов) грибом *Phycomyces blakesleeanus* посвящено значительное число исследований.

Так, Бруккер [36—38] изучал биосинтез фенолкарбоновых кислот при культивировании этого гриба на среде, содержащей 30 *г* глюкозы, 2 *г* глицина, 0,5 *г* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 *г* KH_2PO_4, 40 *мкг* тиамина в 1 *л* воды; pH 5,0. Из 20 культур гриба различного происхождения автор отобрал активный штамм по образованию фенола. Наличие фенолов определялось в культуральной жидкости и экстракте из пленки гриба. При упомянутых условиях культивирования в мицелии содержится около 10% образуемых фенолов. Гриб выращивался до 12-дневного возраста на указанной среде с добавлением различных веществ — ингибиторов определенных ферментных систем.

Установлено, что Na-флуорацетат в концентрации 10^{-4} *г/л*, малоновая кислота, фтористый натр мало влияют на биосинтез

фенолов грибом. Ингибиторы сульфгидрильных ферментов и соли тяжелых металлов тормозят образование фенолов, независимо от интенсивности роста мицелия. Так, при концентрации 10^{-5} *г/л* в среде ингибиторов этих ферментов — Na-п-хлормеркурибензоата, Na-о-йодбензоата, йодуксусной кислоты или сульфата меди — отмечено снижение содержания фенолов на 75%, а уменьшение веса мицелия — только на 25% против контроля. По мнению автора, блокирование разложения сахара при оксидативном декарбоксилировании α-кетоглютаровой кислоты может способствовать активированию глюкозо-6-фосфата и повышению содержания фенолов.

Вещества, тормозящие карбонильные группы,— гидроксиламин, семикарбазид — в концентрации $6 \cdot 10^{-5}$ М вызывали даже незначительное увеличение веса мицелия (на 13%) и на 50% снижали содержание фенолов. Ингибиторы, образующие комплексы с тяжелыми металлами и блокирующие окислительные металлосодержащие ферменты значительно снижают рост мицелия и содержание фенолов (до 75%). Автор предполагает, что в биосинтезе фенолов *Phyc. blakesleeanus* принимают участие глюкозофосфатный цикл и цикл окислительного дезаминирования и декарбоксилирования аминокислот, особенно тирозина и других азотсодержащих органических соединений.

Сакамото [70 а, 70 б] показал, что при метаболизме флавонола *Penicillium* sp. в качестве промежуточных продуктов образуются галловая и флороглюцинкарбоксиловая кислоты, Сакамото, Ногуши, Уэстлайк, Симпсон установили, что при гидролизе рутина *Pen. brewicompactum, Asp. niger* в качестве промежуточного продукта образуется протокатехиновая кислота (см. раздел «Разные ферменты»).

В обзоре Биркиншоу [31], кроме упомянутых выше соединений, являющихся продуктами грибного метаболизма, указываются такие, как этилен, образуемый *Pen. digitatum* при дегидрировании этанола; олигопептиды, производные пиридина, хинолина, индола и многие другие. Автор отмечает, что в настоящее время известно около 400 веществ разнообразной химической природы, образуемых в процессе метаболизма разными видами микроскопических грибов.

Метаболизм углеводородов у различных видов микроскопических грибов изучался многими исследователями. Однако в настоящее время этот вопрос имеет не только большой теоретический интерес, но и определенную практическую значимость. Исследования Тауссона [26—28] по энергетике метаболизма некоторых углеводородов *Asp. niger* и другими видами грибов относятся к первым наиболее обстоятельным работам этого плана в отечественной литературе. В более поздних обзорах Берштехера [32], Фостера [45] как способные усваивать углеводороды нефти (парафины, газообразные алканы — этан,

пропан) указываются *Asp. flavus, Botrytis cinerea, Pen. notatum* и другие виды пенициллов; *Asp. fumigatus, Asp. niger, Asp. versicolor, Acremonicum patron, Cephalosporium roseum, Fus. oxysporum, Monilia bonozdenii.*

Билай, Пидопличко, Гутыря и др. [5] изучили способность разных видов и штаммов *Mucorales,* родов *Aspergillus, Penicillium, Trichoderma* и некоторых других выделенных из почвы ризосферы сельскохозяйственных растений, усваивать различные углеводороды нефти как источники углерода. Были испытаны различные парафины нефти, нефтяные фракции, смеси нефтепродуктов, а также синтетические углеводороды—жирные кислоты (C_{5-6}, C_{7-9}, C_{10-16}, C_{17-20}) и жирные спирты — вторичные и первичные. Установлено, что «спектр» использования испытуемых углеводородов различен для отдельных видов. Авторы считают, что изучаемые грибы могут быть подразделены на две основные группы: у представителей одной активное использование углеводородов нефти сопровождается интенсивным ростом мицелия, у представителей второй значительного увеличения биомассы не наблюдается.

Бхаттахарийя и др. [33, 34, 68] описали превращение терпенов и сесквитерпенов видами грибов, которые при поражении древесины *Aquilaria agallocha* придают ей характерный запах.

Терпены — углеводороды, имеющие большей частью общую формулу C_{10} H_{16}, входят, как и их производные, в состав эфирных масел различных растений. К производным терпенов относятся такие соединения, как линаллол, гераниол, цитронеллол, содержащиеся в цветах ландыша, розы и маслах цитрусовых, эвкалипта и других растений, а также лимонен, содержащийся в скипидаре, масле укропа, тмина, ментол, входящий в состав масла мяты, пирен, камфора и др. (Кретович, 1964).

Сесквитерпены — углеводороды, содержащиеся также в эфирных маслах и имеющие более сложное строение — $C_{15}H_{24}$.

Из древесины были выделены *Pen. steckii, Geotrichum* sp., *Asp. versicolor, Asp. niger, Cladosporium* sp. и др.

В опытах авторов грибы выращивались глубинным методом на среде Чапека в течение 24 *час,* а затем, после добавления 0,5 *мл* α-пинена, ферментация продолжалась еще 24 *час.*

Наиболее активно α-пинен разлагался культурой *Asp. niger* — из 2,15 *г* его добавленных в 100 *мл* среды через 24 *час* осталось неиспользованным 0,302 *г.* При ферментации культурой *Asp. steckii* осталось неиспользованным в этих же условиях 0,351 *г,* а культурами остальных видов грибов — свыше 0,4 *г.* Превращение 0,5%-ного раствора α-пинена в 24-часовой культуре адаптированным штаммом *Asp. niger* происходило на протяжении 4—8 *час.* (рис. 57). При этом мицелий гриба, выращенного на среде Чапека — Докса, дважды использовался для

превращения α-пинена. В качестве продуктов в среде отмечены вербенол — 20—25%, вербенон — 2—3%, собрерол — 2—3%. Остальной α-пинен, как считают авторы, был метаболизирован грибом до более простых соединений или окислен до углекислоты и воды. Интенсивность окисления α-пинена зависела от его концентрации в среде, продолжительности ферментации.

При ферментации других моно- и сесквитерпенов — карана, 3-карена, α-сапталена, гумилена — культурой *Asp. niger* также

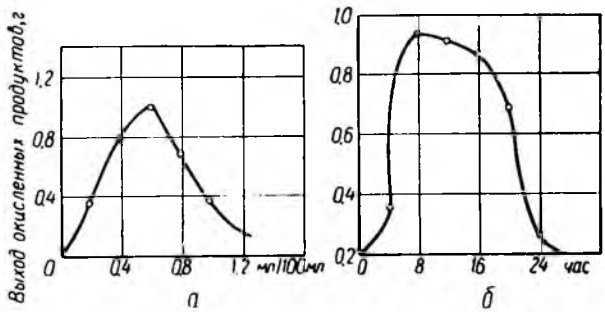


Рис. 57. Превращение α-пинена *Aspergillus niger* (по Prema и др.):

а — влияние концентрации α-пинена (*мл*/100 *мл* среды) на выход продуктов превращения; *б* — активность разложения α-пинена в зависимости от продолжительности ферментации.

получен ряд оксипроизводных. Авторы отмечают, что гидроксилирование карана и карена в полжении 6 и раскрытие кольца позволяет использовать полученные вещества в синтезе ментола или изоментола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аристовская Т. О разложении сульфокислот микроорганизмами.— Почвоведение, 1958, 11.

2. Аристовская Т., Паринкина О. Новые методологические приемы изучения сообществ почвенных микроорганизмов.— Почвоведение, 1961, 1.

3. Арцыховская Е. и др. О механизме устойчивости капусты к Botrytis cinerea, 1964.

4. Беккер З. Гумус почвы и грибы — продуценты антибиотиков.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1959, 1.

5. Білай В. та ін. Вуглеводні нафти як джерела вуглецю для мікроскопічних грибів.— Мікробіол. ж., 1965, 2.

6. Буткевич В. Бензольные производные как промежуточная ступень при использовании грибами хинной кислоты.— Тр. Тимирязевского ин-та, М., 1929.

7. Былинкина В. Микроорганизмы, минерализующие гумусовые вещества почв.— Тр. Всесоюз. н.-и. ин-та с.-х. микробиол. ВАСХНИЛ за 1941—1945 гг., 1949.

8. Гейсман Г. Антоцианы, халконы, ауроны, флавоны и родственные им водорастворимые растительные пигменты.— В кн.: Биохим. методы анализа растений. Пер. под ред. М. Запрометова. ИЛ, М., 1960, 453.

9. Губанов Г., Бредихина А. Рост грибов *Fusarium vasinfectum* Ath. и *Verticillium dahliae* Kleb. при наличии в среде различных фенольных веществ и гликозидов.— Узб. биол. ж., 1964, 2, 22.

10. Капустинский А. Иммунитет пигментированных растений и антибиотики.— Усп. совр. биологии, 1950, **29**, 370.

11. Кононова М. Органические вещества почвы. Изд-во АН СССР, М., 1963.

12. Ладыгина М., Рубин Б. О действии токсина *Botrytis cinerea* на цитохромоксидазу капусты.— ДАН СССР, 1957, **116**, 459.

13. Манская С., Кодина Л. Биосинтез и распад лигнина. Тр. Ин-та лесохоз. проблем и химии древесины АН ЛатвССР, 1960, **19**. 13.

14. Мишустин Е., Никитин Д., Очилова М. Микроорганизмы, разлагающие гуминовую кислоту почвы.— Докл. сов. почвоведов к VII Междунар. конгр. в США. Изд-во АН СССР, М., 1960.

15. Мишустин Е., Никитин Д. Атакуемость гуминовых кислот почвенной микрофлорой.— Микробиология, 1961, **30**, 5.

16. Новотельников Н., Ежов И. Об антибиотических и антиокислительных свойствах желтых пигментов зерна.— ДАН СССР, 1954, **99**, 297.

17. Приселков М., Самсонова М., Пушкарь Э. Использование микроорганизмами алкалоидов дитаина и хинина.— Аптечное дело, 1958, 7, 31.

18. Рубин Б., Арцыховская Е., Проскурникова Т. Окислительные превращения фенолов и их роль в явлениях устойчивости картофеля к *Phytophthora infestans*.— Биохимия, 1947, **12**, 141.

19. Рубин Б., Волобуева Н. Активность полифенолоксидаз тканей хлопчатника в связи с устойчивостью растений к грибку *Verticillium albo-atrum*.— ДАН СССР, 1951, **79**, 637.

20. Рубин Б., Иванова Т. О системе полифенолы — полифенолоксидаза в капусте.— ДАН СССР, 1959, **125**, 213.

21. Рубин Б., Арцыховская Е. Биохимия и физиология иммунитета растений. Изд-во АН СССР, М., 1960.

22. Рубин Б., Иванова Т. Влияние продуктов окисления флюроглюцина на дегидрогеназы *Botrytis cinerea*.— ДАН СССР, 1963, **153**, 1439.

23. Рубин Б. Биохимия иммунитета растений.— Тез. докл. I Всесоюзн. съезда биохимиков. Л., 1964.

24. Соколова В. О токсичности хлорогеновой кислоты и ее дериватов— кофейной и хинной кислот по отношению к грибу *Phytophthora infestans*.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1963, 5, 707.

25. Соколова В. Роль некоторых фенольных соединений в явлениях иммунитета.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохимиков. Л., 1964.

26. Таусон В. К вопросу об усвоении парафинов микроорганизмами.— Ж. рус. бот. об-ва, 1925, 9.

27. Таусон В. Превращение энергии микроорганизмами. Микробиология, 1939, 8.

28. Таусон В.— Основные положения растительной биоэнергетики. Изд-во АН СССР, М.—Л., 1950.

29. Шапошников В., Работнова Н. О развитии плесневых грибов за счет натурального каучука. Микробиология, 1963, **32**.

30. Шуберт Т., Бардинская М. Биохимические превращения и физиологическая роль некоторых фенольных соединений в растениях.— Тез. докл. I Всесоюз. съезда биохим. Л., 1964.

31. Birkinshaw J. Miscellaneus of fungal metabolism.— In: Biochem. Ind. Microorganisms. Ed. C. Reinbow, A. Rose. Acad. Press, 1963, 453.

31a. Birkinshaw I. Quinones as metabolic products of microorganisms.— Planta med., 1959, 7, 367.

32. Beerstecher E. Petroleum microbiology. New York. 1954.

32a. Boing J. Schimmelbefall einer Paraffinemulsion.— Zbl. Bacteriol., 1958, Abt. II, III, 1.

33. Bhattacharyya P., Prema B., Kulkarni B. Microbial transformation of terpenes. I. Hydroxilation of α-pinene.— Nature, 1960, **187**, 689.

34. Bhattacharyya P., Prema B., Dhavalikar. Microbial transformation of terpenes. IV. Structure of an anhydride obtained after fermentation of some terpenoid hydrocarbons by *Asp. niger*.— Ind. J. Chem., 1963, **1**, 171.

35. Bocks S., Smith Z., Norman R. Hydroxylation of phenoxyacetic acid and anisole by *Aspergillus niger* (v. Tiegh.).— Nature, 1964, **201**, 3981.

36. Brucker W. Protocatechinsäure durch Phycomyces blakesleeanus.— Planta, 1957, **48**, 5, 627.

37. Brucker W. Hemmungsanalytische Studien zu Phenolcarbonsäurebildung durch Phycomyces blakesleeanus.— Arch. Microbiol., 1957, **26**, 302.

38. Brucker W., Hashem M. Zur Biogenese von Shikimisäure und ihrer Beziehung zur Phenolkarbonsäure-Bildung durch Phycomyces.— Ber. dtsch. Bot. Ges., 1962, **75**, 3.

39. Champagnat A. Biosynthèse de concentrés protéinesvitamines à pertiz du petrole.— Rev. Inst. Fr. petrol, 1962, **17**, 1372.

40. Chiarappa L. Extracellular oxidative enzymes of wood-inhabiting fungi associated with the heart rot of living grapevines.— Phytopathology, 1959, **49**, 578.

40a. Dagley S., Evans W., Robbins D. New pathway in the oxidative metabolism of aromatic compounds by microorganisms.— Nature, 1960, **188**, 560.

41. Davis D., Waggoner P., Dimond A. Conjugated phenols in the Fusarium wilt syndrome.— Nature, 1953, **172**, 4386, 959.

42. Doin W. Production and properties of a polyphenol oxidase from the fungus Polyporus versicolor.— Canad. Bot. J., 1952, **30**, 9.

43. Evans W. The microbiological degradation of aromatic compounds.— J. Gen. Microbiol., 1963, **32**, 177.

44. Farkas G., Ledingham G. Studies on the polyphenol-polyphenoloxidase system of wheat stem rust uredospores.— Canad. J. Microbiol., 1959, **5**, 37.

45. Foster J. Hydrocarbons as substrates for microorganisms.— Antonia van Leeuwenhoek, 1962, **28**, 3.

46. Friedrich H. Der Abbau von phenolischen Substanzen durch *Aspergillus niger*.— J. Arch. Microbiol., 1956, **25**, 297; 371.

47. Haider K., Sim S., Flaig W. Untersuchungen über die Einwirkung von Mikroorganismen auf C^{14}-markierte phenolische Verbindungen.— Landwirtsch. Forsch., 1962, **15**, 196.

48. Henderson M. Farmer Utilitation by fungi of p-hydroxybenzaldehyde, ferrulic acid, syringaldehyde and vanilline.— J. Gen. Microbiol., 1955, **12**, 37.

49. Henderson M. A study of the metabolism of phenolic compounds by fungi using spore suspensions.— J. Gen. Microbiol., 1956, **14**, 684.

50. Henderson M. Metabolism of methoxylated aromatic compounds by soil fungi.— J. Gen. Microbiol., 1957, **16**, 686.

51. Henderson M. The influence of trace elements on the metabolism of aromatic compounds by soil fungi.— J. Gen. Microbiol., 1960, **23**, 307.

52. Henderson M. Isolation, identification and growth of some soil hyphomycetes and yeast-like fungi which utilize aromatic compounds lerated to lignin.— J. Gen. Microbiol., 1961, **26**, 149.

53. Howard B., Raistrick H. Studies on the biochemistry of microorganisms. The colouring matters of *Penicillium islandicum* Soop. Pt. 1, 2, 3, 4.— Biochem. J., 1954, **44**, 227.

54. Hurst H. Aromatic acid — reducing systems in fungi.— Enzyme Chem. Phenol. Compounds. Pergamon Press. Oxford—London—New York—Paris, 1963, 121.

55. Galanti M. A propos de l'action de quelques dérivés phénoliques sur

le métabolisme d'une souche d'*Aspergillus terreus*.— Arch. int. physiol. et biochim.. 1959, **67**. 1, 112.

56. Godtfredsen W. et al. Microbiological hydroxylation of certain indole alkaloids.— Experientia, 1958, **14**, 88.

57. Gottlieb S., Michael S., Pelczar Ir. Microbiological aspects of lignin degradation.— Bacteriol. Rev., 1951, **15**, 55.

58. McKee R. Factors affecting the toxicity of solanine and related to *Fusarium caeruleum*.— J. Gen. Microbiol., 1959, **20**, 686.

59. Kuc J. Chlorogenic and caffetic acids as fungistatic agents produced by potatoes in response to inoculation with *Helminthosporium carbonum*.— J. Ann. Chem. Soc., 1956, **78**, 3123.

60. Lross S., Lafford R., Tatum E. The metabolism of protocatechuic acid by Neurospora.— J. Biol. Chem., 1956, **219**. 781; 797.

61. Madhosingh C. The metabolic detoxication of 2.4. dinitrophenol by *Fusarium oxysporum*.— Canad. J. Microbiol., 1961, **7**, 553.

62. Matta A., Dimond A. Symptoms of *Fusarium* wilt in relation to quantitiv of fungus and enzyme activity in tomato stems.— Phytopathology, 1963, **53**, 574.

63. Nishimura S. Pathochemical studies on watermelon wilt, 12. Isolation of phenolic substances causing vascular discololation.— Ann. Phytopathol. Soc. Jap., 1959, **24**, 139.

64. Nishira H. Некоторые аспекты таниновой кислоты. Разрушение ферментов плесневых грибов таниновой кислотой.— РБЖ, 1964. 9Б, 146. (Sci. Repts Hyogo Univ. Agric. Ser. Agric. Chem., 1962, 5, 2, 117).

65. Nogushi Y. The degradation of flavonols by *Pullularia fermentans* v. *candida*.— Bot. Mag., Tokyo, 1963, **76**, 191.

66. Oku H. Biochemical studies on phenols and the role of polyphenoloxidase of the fungus.— Phytopathol. Zs., 1960, **38**, 4, 342.

67. Ottey L., Tatum E., Protocatechuic acid oxidase of Neurospora.— J. Biol. Chem., 1956, **223**, 307.

68. Prema B., Bhattacharyya P. Microbiological transformation of terpens. II. Transformation of α-pinene. III. Transformation of some mono- and sesquiterpenes.— Appl. Microbiol., 1962, **10**, 524; 529.

69. Raman T., Shanmugasundaram E. Metabolism of some aromatic by Aspergillus niger.— J. Bacteriol., 1962, 84, 6, 1339.

70. Rich S., Horstall J. Relation of polyphenol oxydases to fungitoxicity.— Proc. Nat. Acad. Sci. (USA). 1954, **10**, 139.

71. Schroter H. Untersuchungen über die Phenolbildung bei Phycomyces blakesleeanus.— Kulturpflanze, 1956, Beih. 1, 49.

71a. Simonart P., Wiaux A. Etude biochimique de *Penicillium griseofulvum* Diern. Production d'acides amino-benzoiques.— Ztrbl. Bakteriol., Abt. II, **112**, 708.

72. Shibata S., Takido M,. Nakajima T. Studies in the metabolic products of fungi. VII. Paper chromatography of the colouring matters of *Penicillium islandicum* Sopp.— Pharm. Bull., 1955, **3**, 286.

72a. Tanenbaum S., Basset E., Kaplan M. Environmental factors relating to tropolone formation by *Penicillium stipitatum*.— Arch. Biochem. a. Biophys., 1959, **81**, 169.

73. Tourneau D., McLean J., Guthrie J. Effects of some phenols and quinones on growth in vitro of *Verticillium alboatrum*.— Phytopathology, 1957. **47**, 602.

74. Valle E. On anti-fungal factors in vitro leaves.— Acta. chem. Scand., 1957, **11**, 357.

75. Virtanen A., Hietala P. Ån anti-fungi factors in rye seedling.— Suomen Kem., 1955, **28**, 165.

76. Walker I., Zink K. Toxicity of phenolic compounds to certain onion bulb parasites.— Bot. gas., 1935, **96**, 468.

77. Wills B. Fungal growth in syrup to Tdn.— J. Pharm. a. Pharmacol., 1958, **10**, 302.

УКАЗАТЕЛЬ ЛАТИНСКИХ НАЗВАНИЙ ВИДОВ ГРИБОВ И ДРУГИХ ОРГАНИЗМОВ, УПОМИНАЕМЫХ В ТЕКСТЕ

Absidia sp. 121
» *orchidis* 149, 227
» *glauca* 224
Acetobacter xylinum 37
Acremonium patron 253
Actinomyces globisporum 232
Agrobacterium tumifaciens 57
Agrostagmus cinnabarinus 37
Alternaria sp. 37, 38, 83, 121, 126, 229, 241
» *brassicola* 135
» *raphani* 135
» *tenuis* 47, 135
Aquilaria agallocha 253
Armillaria 121
Arthrobotrys oligospora 192
Ascochyta sp. 121
» *fabae* 205
Aspergillus sp. 14, 19, 37, 53, 61, 80, 94, 97, 131, 135, 163, 225, 229, 234, 241, 253
» *alleaceus* 101
» *aureus* 68, 73, 74
» *amstelodany* 38, 235
» *awamori* 13, 18, 19, 26, 27, 96, 101, 225, 235
» *batatae* 53, 54
» *caespitisus* 132
» *calyptatus* 177
» *chavalieri* 231
» *clavatus* 76, 191, 235, 390
» *faetidus* 73, 85
» *flavipes* 229
» *flavus* 39, 95, 100, 101, 102, 104, 121, 122, 124, 125, 126, 130, 135, 189, 190, 191, 207, 229, 235, 253
» *fumigatus* 39, 83, 128, 191, 235, 250, 253
» *lichinensis* 39
» *nidulans* 102, 104, 151, 152, 153, 235, 251
» *niger* 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 24, 26, 27, 36, 39, 44, 45, 46, 51, 52, 53, 57, 60, 63, 72, 73, 76, 80, 83, 85, 87, 95, 96, 97, 98, 101, 109, 116, 117, 118, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 151, 152, 225, 226, 235, 242, 243, 252, 253, 254
Aspergillus ochraceus 95, 226, 231
» *oryzae* 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 38, 44, 45, 53, 54, 60, 94, 95, 97, 99, 100, 102, 104, 128, 130, 132, 189, 207, 231, 235, 236
» *parasiticus* 94, 102, 130
» *quadrilineatus* 151, 250
» *repens* 235
» *saitoi* 95, 96, 225
» *sclerotiorum* 235
» *soya* 95
» *sulfureus* 235
» *sydowi* 39, 83, 235
» *tanarii* 101, 128, 131, 235
» *terreus* 38, 76
» *terricola* 94, 101, 103, 104, 105, 235
» *variecolor* 151, 253
» *vergicolor* 235
» *violaceus* 151
» *wenthii* 235
» *usamii* 18, 19, 27, 96
» *ustus* 235
Avena bysantina 198
Bacillus megatherium 194
» *subtilis* 194
Botryotrichum 121
Botrytis sp. 37, 73, 121, 241
» *allii* 245
» *cenerea* 47, 73, 74, 76, 135, 147, 170, 247, 253
Calonectria decora 227, 229

Candida stellatoidea 170, 174
» *vulgaris* 195
Cephalosporium sp. 38, 121, 126, 241
» *graminearum* 83
» *roseum* 228, 253
» *subverticillatum* 229
Ceratostomella ulmi 73
Cercospora salini 59, 60
Corticium sasaki 228
» *vagum* 195
Chaethomella sp. 241
Chaethomium sp. 37, 38, 53, 121
» *cochlioides* 59
» *globosum* 38, 53, 54
» *indicum* 38
Cilcinalua achrospora 59
Circinella sp. 227
Cladosporium sp. 76, 177, 253
» *cucumerinum* 47, 49, 76, 81, 133
» *herbarum* 37
» *resinae* 231
Claviceps purpurea 161, 162
Coccospora 121
Cochlioides miyabeans 246, 247
Colletotrichum circinans 245
» *fuscum* 204
» *phomoides* 76, 228
Coniothyrium 241
Conoiphora cerebella 38
Cordyceps militaris 132
Corticium vagum 195
Cunninhamella sp. 94
» *blaeesleeana* 224, 227, 234
» *echinulata* 134
» *elegans* 225
Curvularia sp. 227
» *lunata* 227, 233
Cylindrocarpon sp. 241
» *radicicola* 59, 229
Darluca filum 148
Dendrodochium toxicum 160, 163, 168, 169, 171, 172, 173, 174, 175, 176
Dematium pullulans 149
Dicoccum 121
Digitalis lanata 204
» *purpurea* 204
Didymella lycopersici 229
Diplodia viticola 55, 56
Diplodina sp. 59, 60
Echerichia coli 194
Epidermophyton floccosum 59
Eremascus fertilis 130
» *albus* 130
Fusarium sp. 37, 47, 80, 95, 121, 126, 181, 226, 234, 391
Fusarium avenaceum 55, 103, 186, 236, 391
» *caucasicum* 226, 229
» *culmorum* 37, 153, 186, 198
» *eyuiseti* 186, 198
» *gibbosum* 95
» *graminearum* 162, 186
» *lateritium* 95, 177, 226, 230
» *moniliforme* 73, 130, 133, 154, 186, 192, 197, 234, 236
» *nivale* 83, 186, 245
» *oxysporum* 47, 76, 147, 154, 186, 192, 197, 236, 243, 253
Fusarium oxysporum f. *conglutinans* 77
» » f. *cubense* 49, 50, 79
» » f. *lini* 78, 128, 129, 234
» » f. *lycopersici* 47, 48, 49, 77, 78, 79, 153, 186, 193, 195, 245
» » f. *vasinfectum* 153, 197, 248
» *roseum* 55, 56
» *solani* 226, 229, 236
» » f. *phaseoli* 153
» *sporotrichiella* 37, 126, 127, 160, 163, 176, 177, 178, 179, 180, 182, 183, 184, 185, 186, 236
Fusarium sporotrichiella v. *poae* 177, 180, 183, 186
Fusarium sporotrichiella v. *sporotrichioides* 180, 186
» *tricinctum* 182
» *javanicum* 251
Gasteria verrucola 133, 134
Geotrichum sp. 253
Gibberella fujicuroi 132
Gleosporium nervisegum 47
» *clasticae* 47
Gliocladium sp. 148, 163
» *ammoniophillum* 177
» *catenulatum* 229, 233
Haematococcus sp. 195
Haplographium sp. 241
Helicoma sp. 59, 60
Helicosporium sp. 228
Helicostylum periforme 227, 228, 234
Helminthosporium cyclopium 46, 47
» *ravelii* 250
» *sativum* 203
» *victoria* 160, 198, 199, 200, 201, 202, 204
» *oryzae* 203

Hermiscium sp. 291
Hormodendron sp. 241, 242, 243
Humicola grisea 149
Hymenopsis sp. 177
Implex lacteus 60
Lactobacillus casei 193
Lichthemia 163
Merulius lacrymans 37
Microsporium lanosum 170
Monilia 83
» *bonozdenii* 253
» *sitophila* 37
Monochaetia unicornis 148
Mortierella 94
» *aplina* 59, 60
» *polycephala* 177
» *candelabrum* 177
» *renispora* 94
Mucurales 94, 154, 253
Mucor 18, 37, 80, 94, 121
» *corymbifera* 224
» *daniliwitsh* 101
» *globosus* 76
» *hiemalis* 76, 134, 177
» *mucedo* 229
» *parasiticus* 224
» *racemosus* 132
» *ramannianus* 132
» *Rouxii* 101
Mycobacterium paratuberculosis 194
Myrothecium verrucaria 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 57, 59, 60
Neurospora crassa 73, 75, 144, 145, 146, 147, 227, 248
» *sitophila* 227
Ophiobolus herpotrichus 227, 228
Ophiobolus sp. 229
Oospora sp. 76
Pellicularia filamentosa 81, 82, 154, 228
Penicillium 18, 37, 60, 61, 80, 94, 97, 121, 126, 133, 134, 135, 163, 225, 226, 229, 241, 243, 249, 250, 252, 253
» *amagasakiense* 109, 116, 117
» *amarum* 250
» *adametzii* 229
» *brevicompactum* 38, 249, 252
» *brefeldianum* 130
» *cannemberti* v. *candidum* 154
Penicillium chrysogenum 28, 103, 109,
» 112, 129, 130, 135, 148, 229, 248
» *citrinum* 231
» *claviforme* 60
Penicillium cyaneo-fulvum 95, 99
» *cyclopium* 38, 207, 249
» *digitatum* 147, 252
» *expansum* 61, 73, 74
» *funiculosum* 58, 130
» *gladioli* 249
» *glaucum* 242
» *griseofulvum* 132
» *islandicum* 186, 187, 188, 250
» *janthinellum* 95, 99
» *lilacinum* 132, 229
» *luteum* 32
» *melinii* 58, 61, 130
» *notatum* 109, 112, 135, 253
» *oxalicum* 46, 47
» *parvum* 130
» *puberulum* 251
» *purpurogenum* 76
» *quadrilineatum* 130
» *royueforti* 150, 151
» *roseo-purpureum* 248
» *rubrum* 191
» *steckii* 253
» *spinulosum* 130, 133
» *stipitatum* 60, 250, 251
» *urticae* 248
» *variabile* 38
» *violaceum* 59, 60
» *viridicatum* 54
» *vitale* 109, 110, 111, 112, 113, 114, 116, 118
Periconia circinata 203, 204
» *oryzae* 147
Pestallotia cinerea 47
» *faedans* 227
Phoma sp. 177
Phycomyces blackesleeanus 121, 134, 228, 249, 251, 252
Phytium aphanidermatum 47, 49, 80, 149, 150
» *arreemones* 149, 150
» *de Baryanum* 246, 73, 76, 80, 149, 150
» *irregulare* 80
» *ultimum* 149, 150
Phytophthora infestans 155, 205, 206, 245, 247
Polyspora lini 170
Polystictus versicolor 59
Pseudomonas sp. 230
» *testosteroni* 233
» *aeruginosa* 195
Pullularia sp. 121, 126
» *pullulans* 128
Pycnodothis sp. 229
Pyrenochaeta sp. 241

Pyrenophora graminea 133
Phabditis sp. 192
Phizoctonia 121
» *ferrugena* 227
» *solani* 47, 49, 84, 133, 207
» *violacea* 132
Rhizopus 14, 27, 94, 121, 222
» *arrhisus* 60, 135, 207, 222
» *cambodjae* 222
» *circinatus* 207
» *delemar* 13, 14, 24, 27, 101
» *nigricans* 129, 221, 222, 223, 224, 226, 232
» *niveus* 27
» *oryzae* 101
» *rodosus* 60
» *stoloniferum* 76, 83, 134, 207
» *tonkinsis* 101
» *tonnensis* 27
» *topkinensis* 18, 19
» *tritici* 73
» *japonicum* 14, 27, 135
Rhodotorula glutinosus 59, 133
Saccharomyces cerevisiae 232
» *vini* 170
Scleritinia 80
» *libertiana* 73
» *sclerotiorum* 37, 76
Scopulariopsis brevicaule 132
Septomyxa affinis 229
Sphaeronema sp. 241
Spirogira nitida 195
Sporotrichum pruinosa 60
Stachybotrys 121
Stachybotrys atra 36, 37, 38, 39, 44, 45, 135
» *alternans* 37, 160, 162, 163, 165, 166, 167
Stachybotrys alternans v. *atoxica* 163
» » v. *jathelii* 163
Staphylococcus aureus 114, 115, 195
Stemphilium 121
Streptococcus faecalis 195
Streptomyces sp. 60, 141
Syncephalastrum sp. 224
Tieghemella 163
Thamnidium elegans 228
Thielavia sepedonium 149
Trichoderma sp. 37, 121, 127, 253
» *album* 60
» *koningi* 36, 37, 46, 94
» *glaucum* 231
» *lignorum* 126, 127, 177
» *viride* 39, 46, 51, 52, 57, 59, 63, 132, 135, 148
Trichophyton crateriforme 170
Trichothecium 121
» *roseum* 37, 38, 63, 135, 227, 234
Torula sp. 59
Ustilago mayidis 148
Ustilago 148, 195
» *zeae* 30
Ustilina sousta 59
Verticillium 121
» *alboatrum* 38, 245
» *dahliae* 73, 248
Wognowicia graminis 228
Xylaria polymorpha 59

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Аглюкон 233, 234
Аденин 132
Аденозиндифосфат 8
Аденозинтрифосфат 8
Алейкия алиментарно-токсическая 177
Алкалоиды 245
Альбумин 99, 103
Альдегиды 240
Амилодекстрин 16
Амилоза 12, 22, 56
Амилопектин 12, 16
Аминокислоты 91, 103, 104, 140, 148
  реакции 144
  влияние токсинов на содержание в растениях 207
  аланин 141, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 180
  аминоадипиевая 145
  аминобутировая 150, 153
  аргинин 142, 145, 150, 151, 152, 179, 180
  аспарагиновая 141, 148, 150, 151, 152, 153, 154, 180, 195, 202
  валин 140, 141, 145, 146, 151, 152, 153, 180, 202
  гистидин 142, 145, 146, 151, 180
  гликокол 316
  глицин 141, 145, 148, 150, 151, 152, 153, 180, 189, 195
  глютаминовая 141, 145, 148, 150, 151, 152, 153, 154, 180, 195, 202
  изолейцин 141, 144, 145, 146, 151, 152, 153
  лейцин 140, 141, 144, 145, 146, 150, 152, 153, 180, 202
  лизин 140, 141, 142, 143, 145, 148, 149, 150, 151, 153, 154, 179, 180
  метионин 140, 141, 145, 146, 148, 149, 151, 152, 153, 179, 180, 202
  норвалин 145, 146
  норлейцин 146
  оксипролин 142, 151
  орнитин 145
  пролин 142, 145, 146, 148, 151, 152
  серин 141, 145, 148, 150, 151, 152, 154, 180
  тирозин 166, 142, 150, 151, 152, 179, 180, 202, 252
  треонин 140, 141, 143, 145, 148, 151, 152, 179, 180
  триптофан 140, 141, 142, 143, 145, 146, 148, 149, 151, 179, 180, 202
  фенилаланин 142, 145, 146, 151, 153, 179, 180, 202
  цистеин 141, 148, 151, 152, 153, 154
  цистин 141, 145, 180
  цитрулин 145, 153
Антибактериальная активность 109, 110
Антибиотики 232
Антрахиноны 248
Арабан 51
Арабиноза 51, 52, 54, 55, 56, 129, 130
Арабит 152
Ароматические соединения 249
Аспертецин 250
Ацетат, метаболизм 131
Белки 91, 92, 93, 94, 100, 103, 196
Бензоксазолин 245
Бензохиноны 248
Болезнь Кашина-Бека 178, 179, 185
Бутилпиридин 197
Вакцины 105
Ваниллин 240
Вербенон 254
Вербенол 254
Витамины 3, 4
Галактан 51
Галактоза 51, 55, 130, 152, 205
Галактозамин 130
Галлотаннин 243
Гексозамин 191
Гемицеллюлоза 52
Гемоглобин 99

Гентизиловый спирт 248, 249
Гепатит 191
Гептанон 131
Гераниол 253
Гидроксибензальдегид 240
Гидроксилирование 221, 224, 225, 226, 227, 228, 233, 254
Гидрохинон 240
Гиперкератоз 185
Гликоген 10
Гликозиды 44, 121, 207, 248
Гликозиды сердечные 233, 234, 236
Глицерин 129, 152
Глюкан 56, 58
Глюконодельталактон 108
Глюкоза 9, 10, 11, 17, 18, 19, 46, 54, 56, 108, 110, 111, 112, 113, 130, 152, 205
Глюкозамин 152
Глюкозо-6-фосфат 8
Глюкозофосфатный цикл 252
Глютамин 150, 153
Глютатион 246, 247
Глютенин 100
Гордеин 100
Гормональные препараты 4, 220, 229
Гормоны 3, 220
Гуанин 145
Гуанозин 132, 145
Гумилен 254
Дегидрогенирование строидов 226
Дезаминирование 252
Декарбоксилирование фузариевой кислоты 197
Деметилирование ароматических соединений 241
Дендродохиотоксикоз 168, 169
Депсиды 248
Депсидоны 248
Дигитоксигенин 234, 235, 236
Дигоксигенин 234, 235
Диогенин 221
Диэтилдитиокарбамат 246
Желатина 84, 85
Железо фитат 131
Жирные кислоты 253
Жирные спирты 253
Изолихинин 61
Индол 145
Индолпроизводные 252
Инозит 152
Казеин 99, 101, 127
Камфара 253
Каран 254
Карен 254
Катехол 242, 246, 247
Кверцетин 121, 122, 124, 125
Кверцитрин 121, 125, 126
Кислоты 240
  аконитовая 152
  аминомасляная 146, 283
  антраниловая 145
  аскорбиновая 246, 247
  аспергилловая 164
  бензойная 127, 241, 243, 248
  ванилловая 241
  вератовая 241
  галактуроновые 69, 71, 72, 81, 84
  галловая 210, 242, 243, 249, 252
  гельвеловая 164
  гидроксибензойная 242, 243
  гиппуровая 126, 127
  гладиоловая 249
  глицериновая 152
  глюконовая 108, 112
  гуаниловая 145
  дигидроксифталевая 249
  желчные 220
  каприловая 131
  капроновая 131
  кетоглютаровая 152
  коевая 164
  коричная 243
  кофейная 128, 245
  лауриновая 131
  лимонная 152
  метилсалициловая 248
  микофеноловая 250
  никотиновая 133, 145
  пектиновая 71, 72, 74
  пенициловая 164
  пинселовая 250
  полигалактуроновая 71
  протокатехиновая 121, 122, 124, 125, 242, 243, 245, 248
  пуберуловая 251
  сиреневая 240
  стипитатовая 251
  таннииовая 240
  фенилуксусная 248
  фенолкарбоновые 251
  феруловая 240
  феноловые 245
  флороглюцинолкарбоновая 121, 252
  фреквентовая 164
  фумаровая 207
  хебулиновая 127
  хинная 220
  хлорогеновая 128, 245, 247
  хризофановая 248, 250
  циклопалдиевая 249
  циклопиевая 249
  яблочная 152
  янтарная 152
Конваллозид 234

Кортизон 221, 223, 225, 228
Крахмал 12, 13, 14, 17, 18, 19
Ксантин 145
Ксантон 248
Ксилан 10, 38, 51, 52, 53, 54, 55
Ксилобиоза 54, 56
Ксилоза 51, 52, 54, 56, 55, 152
Ксилоолигосахариды 54, 56
Ксилогексаоза 54
Ксилопентаоза 54
Ксилотетраоза 54
Ксилотриоза 56
Кутин 133
Лактоза 46
Лактон дельта 111, 112
Ламинариобиоза 61
Ламинарин 57, 59
Ламинаринодекстрины 59
Левомицитин 115
Лецитин 135
Лимонен 253
Линаллол 253
Лихенин 60
Маннит 152
Манноза 51, 152, 205
Маннан 51
Мальтоза 15, 17
Мальтоза изо 15, 16, 22
Мальто-олигосахариды 16
Мацерация 70, 83
Ментол 253, 254
Матиламинкетон 131
Метилпропилкетон 131
Метилирование фузариевой кислоты 197
Микодекстран 61
Микроцид 109, 113, 114, 118
Микроэлементы 21, 38, 130, 241
Митохондрии 129, 203
Мицерин 115
Моносахариды 9, 10
Нафтохиноны 248
Ниацин 145
Нигероза 61
Нидулин 251
Никотинамид 133
Новобиоцин 115
Нотатин 109
Нуклеотиды 132
Окисление кетаглютаровое 203
Оксидигитоксигенин 235
Оксипрогестерон 221, 223, 226
Олигопептиды 252
Олигосахариды 130
Осахаривающая способность 15
Паноза 22
Папилломатоз 185
Парафины нефти 252, 253
Патогенность 79
Патулин 164, 248
Пектин 10, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 84, 85, 87
  лимонный 81
  яблочный 80
Пенициллин 109, 114
Пентапептид 202
Пентозаны 51
Пепсин 96, 97
Пептиды 91, 92, 152
Перекись водорода 109, 112
Пинен 253, 254
Пирен 253
Пиридинпроизводные 252
Пирогаллол 240
Пирокатехин 240
Пневмомикотоксикозы 165
Полигалактурониды 77
Полимиксин 115
Полисахариды 10, 12
Полипептиды 91, 103
Полифенолы 246, 247
Полиурониды 76
Прогестерон 221, 222, 223, 225, 228, 331
Производные жирных кислот 180
Протопектин 69
Пурин 132, 145
Рамноза 121, 125
Рибоза 152
Рибофлавин 133
Ривелин 250
Рутин 121, 122, 123, 125, 126, 233, 252
Рутиноза 121, 122, 123, 125
Салицин 57
Сантален 254
Сахара 196
Сесквитерпены 253, 254
Соберрол 254
Соласодин 221
Спинулозин 250
Стахиботриотоксикоз 163, 164, 165
Стерины 180
Стероиды 220, 225
Стероидные гликозиды 221
Стероидальные сапонины 180
Стероиды, трансформация 221, 224, 225, 226, 227, 229, 232
Стрептомицин 115
Таннин 127, 242, 247
Терпены 253
Тестолактон 226
Тестостерон 226
Тетрациклин 115
Толухинон 248
Токсины 160, 161, 203, 205, 206, 207

Токсины
амин трициклический вторичный 202
аспергилломаразмин 207
афлатоксины 189, 190
виктотоксинин 198, 201, 202, 203
виридин 164
глиотоксин 164
дегидрофузариевая кислота 195
дендродохины 168, 169, 170, 172, 174, 175, 176
диацетоксисцирпенол 198
исландин 186
коллетотин 204, 336
кохлиоболин 203
кульмомаразмин 198
ликомаразмин 193
лютеоскирин 186, 187, 188
мальторизин 189
пентапептид 202
пептид хлорсодержащий 188
поин 180, 181
поэфузариногенин 181
спорофузарин 180, 181
стахиботриотоксины 163, 166, 167
сцирпентиол 198
фузариевая кислота 193, 194, 195, 196, 197
фузарин 176, 186
фумагиллин 164
триметиламин 135
трипсин 97, 98, 99
трипсиноген 94, 98
тропolon 248
Углеводороды 240, 248
синтетические 252, 253
нефти 252, 253
Углерод окись 122, 124
Уридин 132
Фениладениннуклеотид 109, 132, 145
Фенолы 207, 240, 241, 244, 245, 247, 248, 252
2-амино-4-нитрофенол 244
4-амино-2-нитрофенол 244
2,4-динитрофенол 244
Ферменты 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12
металлсодержащие 205
окислительные 8, 198, 233
альдолаза 128, 135
амидазы 8, 135
амилазы 12—29, 135, 101, 102, 104
амилоглюкозидаза 16
арилсульфатаза 134
аспарагиназа 8
бутираза 135
гексокиназа 130
гемицеллюлаза 33, 51
Ферменты
гидрогеназа сердечных гликозидов 234
гидролаза 7, 8, 234
гиппуриказа 126, 127
глицерофосфатаза 135
глюканаза 56, 57, 60, 61
глюкоамилаза 13, 27
глюкозидазы 13, 35, 44, 45, 46, 59, 122, 234
глюкозооксидаза 108—118
глютаминаза 99
деамидаза 133, 135
дегидразы 128, 129, 145, 146
дегидрогеназа 116, 129, 135, 147, 247, 248, 203
декстриназа 15, 20, 23
изоцитратаза 131
инвертаза 44, 110, 130, 135
карбогидраза 8, 128
карбооксиметилцеллюлаза 43, 50
каталаза 110, 112, 116, 135
кутиназа 133, 134
кверцетиназа 122, 123, 124, 125
кверцитриназа 121, 122, 126
ксиланаза 53—56
ламинариназа 58, 59, 60
лакказа 412
липаза 7, 135
малатсинтеаза 131
мальтаза 135
микодекстраназа 61
мононуклеотидаза 132
нуклеодеаминаза 135
нуклеофосфатаза 135
оксидаза 135, 145
полифенолоксидаза 246, 247, 248
сукциноксидаза 203
фенолоксидаза 245, 246
цитохромоксидаза 129, 198
пектиназа 69—88
пектингалактуроназа 71, 77, 80, 81, 83, 84, 86
пектинделимераза 77
пентозаназа 51, 52
пептидаза 8, 93, 95, 99
полигалактуроназа 72, 76, 135
протеиназы 8, 21, 25, 27, 91—105, 135
протопектиназа 71, 135
редуктазы 129, 131, 244
рибонуклеодеполимераза 132
раффиназа 135
ренназа 135
рибонуклеаза 135
рутиназа 121, 122, 123, 124, 125, 126
сульфатаза 8

Ферменты
танназа 7, 127
тиаминаза 135
тирозиназа 247
трансаминазы 131, 145, 146
трансглюкозидазы 16, 17, 18
трансфруктозидаза 130
трансферазы 8, 13, 35
триптофандесмолаза 146
уреаза 8, 135
ферразы 8
фитаза 131
фосфатазы 8, 131, 133
фосфорилазы 8, 135
хитиназа 135
хлорогениказа 128
холинсульфокиназа 134
целлобиаза 43, 44, 47
целлюлаза 33, 51, 83, 135
цитраза 135
эрипсиназа 135
эстераза 7, 124, 234
пектинэстераза 7, 71, 76, 77, 79, 80, 81, 83, 84, 86
рутинэстераза 124, 125
флавоны 121
флавонол 252
флавопротеин 109
флороглюцин 240, 247, 248
флороглюцинол 121
Ферменты
фосфорилхолин 135
фруктоза 130, 152
Хинолинпроизводные 252
Хиноны 240, 245, 248
Хитин 10
Холестерин 134, 229, 220
Холестерол 134
Холин 134, 146
Холинсульфат 134, 229
Целлобиоза 43, 44, 46, 47, 56, 81
Целлодекстрины 43
Целлофан 38, 39, 47
Целлюлоза 10, 33, 34, 36, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 48, 51, 56, 81
гидрооксиметилцеллюлоза 39
карбоксиметилцеллюлоза 36, 39, 40, 41, 42, 46, 47, 48, 49, 56, 81
метилцеллюлоза 38, 40
Цирроз печени 187
Цитидин 132, 146
Цитринин 164
Цитохром *а, б, с* 273
Цитронеллол 253
Яваницин 251
Эндотоксины 191
Эргостерин 134, 221
Эритромицин 115
Эстрон 230
Этанол 252
Этилен 252

СОДЕРЖАНИЕ

Введение 3
Литература . . . 5
I. ФЕРМЕНТЫ 6
Краткие сведения . . . 6
Амилазы 12
Литература . . . 29
Целлюлазы и геммицеллюлазы 33
Литература . . . 63
Пектиназы 69
Литература . . . 88
Протеиназы 91
Литература . . . 105
Глюкозооксидазы . . . 108
Литература . . . 119
Другие ферменты . . . 121
Литература . . . 136
II. АМИНОКИСЛОТЫ . . . 140
Литература . . . 155
III. ТОКСИНЫ 160
Токсины грибов, вызывающих алиментарные токсикозы человека и животных 161
Токсины фитопатогенных грибов 192
Литература . . . 208
IV. ПРЕВРАЩЕНИЕ СЛОЖНЫХ СОЕДИНЕНИЙ . . 220
Превращение стероидов. —
Литература . . . 236
Превращение фенолов, углеводородов и других сложных соединений . 240
Литература . . . 254
Указатель латинских названий видов грибов и других организмов, упоминаемых в тексте 258
Предметный указатель . 262

ВЕРА ИОСИФОВНА БИЛАЙ

Биологически активные вещества микроскопических грибов и их применение

Печатается по постановлению ученого совета Института микробиологии и вирусологии им. акад. Д. К. Заболотного Академии наук Украинской ССР

Редактор
Е. М. Архипова

Художественный редактор
В. А. Коломейчук

Оформление художника
В. И. Смородского

Технический редактор
Е. Н. Розенцвейг

Корректоры
Л. А. Кулинская,
А. Д. Яковенко.

БФ 05373. Зак. № 165. Изд. № 107. Тираж 1550. Формат бумаги 60×90¹/₁₆. Печ. физ. листов 16,75+4 вкл. Учетно-изд. листов 19,65. Условн. печ. листов 17,25. Подписано к печати 28.VIII 1965 г. Т. п. 1965. Поз. 246. Цена 1 руб. 18 коп.

Издательство «Наукова думка», Киев, Репина, 3.
Киевская книжная типография № 5 Государственного комитета Совета Министров УССР по печати, Репина, 4.