

ФЕРМЕНТ ГЛЮКОЗОКСИДАЗА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

«НАУКОВА ДУМКА»

М. Ф. ГУЛЫЙ, В. И. БИЛАЙ, Н. М. ПИДОПЛИЧКО,
Р. Г. ДЕГТЯРЬ, Е. А. НИКОЛЬСКАЯ

ФЕРМЕНТ ГЛЮКОЗООКСИДАЗА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Глюкозооксидаза в настоящее время находит широкое применение в медицине и пищевой промышленности как специфический реактив для определения глюкозы и средство, улучшающее качество и предотвращающее порчу пищевых продуктов при хранении.

В работе обобщен опыт иностранных ученых и многолетние данные авторов по изучению гриба — продуцента глюкозооксидазы, рассмотрены методы его культивирования, выделения и очистки, содержатся характеристика фермента, технологическая схема его получения, ряд методов определения активности и основные данные по применению фермента в медицине и пищевой промышленности.

Рассчитана на научных работников в области микробиологии, биохимии, химии и физиологии, а также на практических работников медицинской и пищевой промышленности.

Высокоочищенные пептиды и белки различного происхождения, обладающие ферментными, гормональными, иммунобиологическими и антибиотическими свойствами, находят все более широкое применение в медицине, пищевой и легкой промышленности и в сельскохозяйственном производстве.

В соответствии с этим с каждым годом растет перечень этих препаратов и расширяется их промышленное производство.

К таким сравнительно новым белковым препаратам относится фермент глюкозооксидаза (β -D-глюкоза: O_2 -оксидоредуктаза 1. 1. 3. 4), продуцируемый грибом *Penicillium vitale*. Этот фермент обладает высокими антибиотическими свойствами, и широкоизвестный антибиотический препарат «микроцид» обязан своим лечебным действием именно наличию в нем фермента глюкозооксидазы.

Высокоочищенные препараты глюкозооксидазы благодаря высокой *специфичности* фермента к глюкозе в настоящее время широко используются как тонкий реактив для наиболее чувствительного и точного метода определения глюкозы в различных по характеру материалах.

Фермент глюкозооксидаза обладает способностью в присутствии глюкозы интенсивно связывать кислород за счет быстрого окисления последней. Поэтому он находит также широкое применение в пищевой промышленности для удаления кислорода и глюкозы там, где присутствие их обуславливает порчу, снижение качества или мешает длительному хранению пищевых продуктов.

Ввиду сказанного интерес к глюкозооксидазе, к методам культивирования его продуцента — гриба *P. vitale*, к методам производства неочищенного и высокоочищенных препаратов фермента, его свойствам и способам применения для указанных выше целей в последние годы чрезвычайно возрос.

Это и послужило причиной для написания краткой монографии, в которую вошли в основном собственные экспериментальные данные авторов, накопленные в результате многолетних исследований различных теоретических и практических вопросов, связанных с производством и использованием указанного фермента.

ГРИБНАЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗА, ЕЕ ПРИРОДА И СВОЙСТВА

Одним из путей биохимического распада гексоз является прямое окисление их молекул с первичным образованием органических кислот с тем же числом атомов в углеродной цепочке.

В настоящее время известно, что прямое окисление глюкозы у многих микроорганизмов с образованием глюконовой кислоты катализируется ферментом глюкозооксидазой, который обнаружен у многих плесневых грибов.

Впервые наличие фермента, катализирующего окисление глюкозы за счет кислорода воздуха, не сопровождающееся выделением CO_2 , было обнаружено в 1904 г. М. А. Максимовым [1] в отпрессованной жидкости *Aspergillus niger*. Максимовым также были получены первые ацетоновые порошки из отпрессованной жидкости *Aspergillus niger*, которые содержали фермент, катализирующий окисление глюкозы. При потреблении кислорода, связанном с окислением глюкозы, Максимов наблюдал подкисление растворов.

В 1928 г. Мюллер [2] подтвердил и дальше развил данные Максимова. Он писал, что Максимов был первым, который наблюдал замечательное обстоятельство повышения потребления кислорода отпрессованной жидкостью из *Aspergillus niger* в присутствии глюкозы. Мюллер показал, что потребление кислорода в равной мере связано как с окислением глюкозы, так и с обра-

зованием кислоты. Он подтвердил данные Максимова [1] о том, что отпрессованная жидкость из *Aspergillus niger* содержит фермент оксидазу, который катализирует окисление глюкозы в кислоту только в присутствии кислорода. Окисления не наблюдается ни в присутствии других акцепторов водорода, ни в анаэробных условиях. Кислота, образующаяся в результате окисления глюкозы указанным ферментом, является монокарбоновой глюконовой кислотой [3]. Мюллер назвал этот фермент глюкозооксидазой. Он показал, что глюкозооксидаза не содержит железа — ее активность не тормозится ни цианистым калием, ни окисью углерода.

Дальнейшими исследованиями Мюллера было установлено, что глюкозооксидаза не катализирует окисления дисахаридов.

При изучении специфичности действия сухих ацетоновых препаратов глюкозооксидазы из *Aspergillus niger* по отношению к различным моносахаридам было показано, что с наибольшей скоростью глюкозооксидаза окисляет глюкозу, однако наблюдается и незначительное окисление маннозы и еще меньше — галактозы [4].

Активный препарат глюкозооксидазы выделили из *Aspergillus niger* и *P. glaucum* Франке и Лоренц [5]. Q_{10} их препарата было порядка 8000, т. е. в 80 раз выше, чем для препаратов, выделенных Мюллером.

Проводя дальнейшую очистку глюкозооксидазы, Франке и Дефнер [6] установили определенную зависимость между активностью различных препаратов глюкозооксидазы и содержанием в них флавина. Это позволило авторам высказать предположение, что простетической группой фермента является флавин. Однако препараты Франке и сотрудников, по-видимому, были плохо очищенными и содержали другие желтые ферменты. Об этом свидетельствует то, что при окислении глюкозы до глюконовой кислоты их фермент может использовать в качестве акцептора водорода не только кислород, но и метиленовую синь.

Следует отметить, что в тканях животных (печени, почках) имеется глюкозооксидаза, которая также окисляет глюкозу до глюконовой кислоты, однако иным путем: глюкозооксидаза животных тканей не может использовать в качестве непосредственного акцептора водорода молекулярный кислород. Она использует в

качестве такого акцептора метиленовую синь либо подобные ей вещества.

Гаррисон [7], изучавший глюкозооксидазу животных тканей, считает, что эта ферментная система комбинируется с кейлиновской системой цитохром — цитохром-редуктаза, в присутствии которой аэробное окисление глюкозы протекает быстрее: цитохром действует в качестве переносчика электронов между кислородом оксидазы и водородом глюкозы. Очевидно, вторая оксидаза, обнаруженная Мюллером [4] в препаратах глюкозооксидазы и способная переносить водород не на кислород, а на другие акцепторы (такие, как 2,6-дихлорфенолиндифенол), как и фермент, выделенный Франке [6] и Огура [8] из *Aspergillus oryzae*, является иным ферментом, находящимся в виде примесей в препаратах глюкозооксидазы.

Дальнейшее широкое изучение глюкозооксидазы из различных плесневых грибов было проведено в 1941—1945 гг. в связи с тем, что активным началом ряда новых антибиотиков, полученных и описанных в эти годы, оказалась глюкозооксидаза.

Как известно из работ начального периода в области изучения физиологии биосинтеза пенициллина, при культивировании отдельных штаммов *Penicillium notatum* и *Penicillium chrysogenum* на среде Чапека с глюкозой и лактозой в культуральной жидкости образуется два антибиотических вещества: первое — во время фазы кратковременного подкисления среды (до pH 3,3—4,0), которое активно против грамположительных и грамотрицательных бактерий; оно было названо нотатином, пенатином, пенициллином В; второе — пенициллин, образующийся при последующем подщелачивании среды до pH 7, сопровождаемое значительным использованием углеводов и азота.

Антибиотики, названные нотатином, пенициллином В, пенатином, оказались аналогичными. Они представляют собой флавопротеиновый фермент, катализирующий окисление глюкозы с помощью молекулярного кислорода, сопровождающееся образованием глюконовой кислоты и перекиси водорода. Этот фермент идентичен ферменту глюкозооксидазе, впервые описанному Максимумым и Мюллером [1, 2, 3, 4]. Последнее название «глюкозооксидаза» так и закрепилось в литературе за

упомянутыми ферментами — антибиотиками. Первым из них детальному изучению был подвергнут нотатин.

В 1942 г. Колхард, Шорт, Михаэлис и др. [9] получили из *Penicillium notatum* антибиотическое вещество, которое отличалось по своим свойствам от пенициллина. Авторы назвали его нотатином. Для получения нотатина авторы [10] использовали две среды — Чапека — Докса (4% глюкозы, pH 6,0—6,5) и среду, измененную добавлением 1 г уксуснокислого и лимоннокислого натрия и 0,0175 г/л сернокислой меди, pH 7,8. На среде Чапека — Докса антибактериальная активность культуральной жидкости (pH 3,5) на мясопептонном бульоне с глюкозой против *Staph. aureus* достигала 1 70 000. Полученная на видоизмененной среде культуральная жидкость при этих же условиях регулярно задерживала рост *Staph. aureus* в разведении 1 1000 — 1 25 000; образование нотатина на этих средах отмечено в первые 3—4 дня роста гриба при pH культуральной жидкости 3,5—4,0. В более позднем возрасте культуры гриба наступало подщелачивание среды и нотатин не образовывался.

В опытах авторов только у отдельных из многих изученных штаммов (свыше 200) отмечено наличие нотатина при щелочной среде одновременно с пенициллином, при этом у штаммов *Penicillium notatum* при пересевах наблюдалась потеря активности.

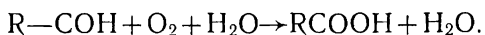
Используемые упомянутыми авторами штаммы *P. notatum*, *P. resticulosum* [10] не обладали инвертазной активностью и при культивировании на среде с сахарозой, а также мальтозой, левулезой нотатин не образовывался. На среде с ксилозой и маннозой отмечалась незначительная антибактериальная активность.

Авторы разработали метод очистки нотатина, основанный на осаждении танином и ацетоном. Изучение свойств полученного сухого препарата показало, что он является ферментом глюкозооксидазой. Спектр абсорбции водных растворов очищенного нотатина (глюкозооксидазы) позволил сделать заключение о принадлежности его к флавопротеинам (водные растворы обнаруживали максимальное светопоглощение при 280 mμ, 375 mμ, 465 mμ). Величина коэффициента светопоглощения при 465 mμ соответствовала антибактериальной активности. Простетическая группа фермента при отще-

плении белка по методу Варбурга и Христиана [11] давала спектр поглощения, подобный спектру рибофлавина. Исследования этих авторов показали, что для проявления антибактериальной активности необходимы следующие условия: присутствие кислорода, глюкозы, отсутствие заметных количеств каталазы.

Очищенные препараты глюкозооксидазы из *Penicillium notatum* (нотатина) полностью тормозили рост *Staphylococcus aureus* в разведении 1 к 1 миллиард и были активны в больших разведениях в отношении других грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

Окисление глюкозы, катализируемое этим препаратом глюкозооксидазы, происходило согласно уравнению:



Полученные результаты позволили авторам заключить, что нотатин является ферментом, подобным глюкозооксидазе из *Aspergillus niger*, но более активным.

В отношении антибиотических свойств препаратов нотатина авторы [9] сообщили, что имеются данные о терапевтическом эффекте с чрезвычайно малыми дозами нотатина.

В дальнейшем, продолжая эти исследования, Брум и Колхард [12] проверили минимальные летальные дозы нотатина для разных животных и установили следующие их величины: для мышей при интраперитонеальном введении — 3 мг/кг, при подкожном — 4,5 мг/кг, при внутривенном — 13,5 мг/кг. Для кроликов соответственно при подкожном — 7,5 мг/кг, при пероральном введении в дозах больших, чем 300 мг/кг, гибель животных не наступала. При внутривенном введении авторы наблюдали смерть с явлениями аноксии, с потерей способности крови переносить кислород и в отдельных случаях с наличием метгемоглобинемии. Смертельные подкожные дозы вызывали гибель несколькими часами позже с явной гипергликемией (у кроликов). Авторы также указывают, что они не смогли обнаружить антибактериальной активности препаратов глюкозооксидазы *in vitro* в присутствии сыворотки крови. Препараты нотатина не предохраняли мышей от стрептококковой, стафилококковой и других инфекций.

В 1943 г. Кошалоти [13] сообщил о получении второ-

го продукта из *Penicillium notatum*, который он назвал пенатином. Кошалоги использовал голландский штамм *Penicillium notatum*. В его опытах также при засеве взвесью конидий из 7-дневной культуры на мальц-агаре наибольшее образование пенатина было отмечено на 3-й день, на среде Чапека—Докса—при pH около 3. Автор отмечает, что обильное спорообразование и пигментация культуральной жидкости в желто-оранжевый цвет связаны с подщелачиванием среды (до pH 6,0—8,0) и отсутствием пенатина. При добавлении к среде кукурузного или дрожжевого экстрактов или коричневого сахара рост мицелия увеличивался, но пенатин также не образовывался. Автор разработал два метода получения очищенного препарата пенатина: первый — осаждение фосфорновольфрамовой кислотой и второй — адсорбция на каолине при pH 4,0 с последующей элюцией фосфорнокислым натрием при pH 6,3 и осаждением диоксидом. Сопоставление свойств очищенных препаратов пенатина со свойствами нотатина привели Кошалоги к выводу об их идентичности и, следовательно, о том, что активным началом пенатина является глюкозооксидаза. Автор не склонен был еще тогда считать пенатин и нотатин, как близкие по природе, идентичными препаратами. Более того, в антибактериальных свойствах нотатина, являющегося ферментом, он усматривал определенную связь между антибиотической и ферментной функциями этого вещества, которое могло выполнять в организме продуцента две функции — метаболическую и антибиотическую. Причину отсутствия устойчивости микробов к пенатину предположительно связывали со строением фермента, устойчивым к воздействию со стороны бактерий.

Антибиотическое действие пенатина на широкий круг грамположительных и грамотрицательных бактерий в основном бактериостатическое. Концентрированный в 200 раз пенатин не инактивировался лошадиной сывороткой. Антибиотическое действие его проявлялось в присутствии глюкозы [14]. Очищенные препараты пенатина обладали малой токсичностью. Внутривенное введение кроликам 16,5 мг этого вещества (очищенного в 200—1000 раз) не вызывало болезненного состояния. Внутримышечное введение его в количестве 10—20 мг морским свинкам также не вызывало болезненных явлений. Введение 250—500 мг пенатина вызывало по-

вышение температуры, отечность в месте введения, но животные не погибали.

Вскоре после описания нотатина и пенатина Робертс, Кайн, Муир и др. [15] описали получение и свойства антибактериального вещества из *Penicillium notatum*, которое они называли пенициллином В и которое также оказалось глюкозооксидазой.

В опытах Робертс, Кайна и сотрудников изучалось три флеминговских штамма *Penicillium notatum*. Грибы выращивались на среде Чапека с 4% глюкозы, также поверхностным способом. В качестве инокулюма использовали взвесь конидий гриба из молодой культуры на мальтозном агаре Сабуро. На 4—5-й день при хорошо сформировавшейся пленке гриба pH равнялось приблизительно 2, антибактериальная активность была слабая; только на 12-й день роста, когда pH подымалось до 4,0, культуральная жидкость достигала максимальной активности (Г 1250 — 1 5000).

Очищенный препарат пенициллина В обладал антибиотическим действием против грамположительных и грамотрицательных бактерий, но был токсичен для мышей и, как было впоследствии установлено, являлся ферментом, аналогичным нотатину.

При добавлении дрожжевого экстракта или замене глюкозы коричневым сахаром pH среды достигало 6,0, образовывался антибиотик типа пенициллина.

Введение больших доз препарата пенициллина В мышам приводило к гибели животных. Эти же количества, введенные небольшими дозами, не оказывали токсического действия.

В дальнейшем Ван-Бругген и сотрудники [16] более подробно изучили и описали свойства пенициллина В. Они установили наличие максимумов спектра поглощения растворов очищенных препаратов пенициллина В при 278, 375 и 425 *mμ*. Растворы простетической группы, отделенной от белка, дали спектры поглощения с максимумами при 450, 374 и 264 *mμ*. Отдельно же спектр флавинаденидинуклеотида показывал максимум светопоглощения при 260, 375 и 450 *mμ*.

Эти авторы провели исследования с целью выяснить, какой из продуктов реакции — перекись водорода или глюконовая кислота — обуславливают антибактериальное действие препаратов. Оказалось, что глюконовая кислота в образуемых количествах почти совершенно

не тормозила роста *Staphylococcus aureus*. Авторы пришли к выводу, что антибактериальное действие препаратов пенициллина В (глюкозооксидазы) основано на действии перекиси водорода. Прибавление к препаратам пенициллина В каталазы приводило к уменьшению накопления в смеси перекиси водорода и вместе с тем к падению антибактериальной активности.

Что же касается субстратной специфичности, то она оказалась у препаратов пенициллина В более низкой, чем у препаратов глюкозооксидазы (нотатина), полученных Колхардом. Очищенные препараты пенициллина В были способны окислять и *d*-маннозу, *d*-галактозу, *d*-ксилозу, правда, с меньшей скоростью, чем глюкозу. Эти расхождения, очевидно, связаны со степенью чистоты препаратов глюкозооксидазы, полученных из разных источников и разными методами.

Изучению свойств нотатина, пенатина и пенициллина В также посвящена работа Бирканшау и Райстрик [17]. Сопоставляя свойства указанных трех антибиотиков, эти авторы пришли к заключению, что они являются одним и тем же веществом — глюкозооксидазой. Дальнейшее изучение свойств этих препаратов подтвердило мнение упомянутых авторов [17].

Колхард, Шорт, Михаэлис и др. [10] разработали более совершенный метод получения очищенных препаратов нотатина и изучили их свойства. Они подтвердили данные о том, что водные растворы очищенных препаратов нотатина обладают максимумом поглощения света при 270/280, 375/380 и 450/460 $m\mu$, что является характерным для желтых ферментов. Однако в противоположность типичным флавопротеинам, которые в видимой части спектра имеют большую величину E (пика) при 450/460 $m\mu$, очищенные препараты нотатина имеют максимум при 380 $m\mu$, что указывает на сходство с печеночной альдегидоксидазой, ксантинальдегиддегидразой, оксидазой молока. Величина коэффициента светопоглощения при 450/460 $m\mu$ соответствует антибактериальной активности. Чистота лучшего препарата нотатина, вычисленная из коэффициента светопоглощения $E_{1\text{см}}^{1\%} = 1,54$, по расчетам, предложенным Варбургом и Христианом [11], была около 90%.

Колхард и сотрудники также показали [10], что пепсин при рН 2,5 и трипсин при рН 7,5 в контакте с очи-

щенным препаратом нотатина (глюкозооксидаза) в течение восьми часов не влияют на его активность. Антибактериальное действие нотатина с их точки зрения является результатом образования перекиси водорода в процессе окисления глюкозы в глюконовую кислоту. В определенных условиях в присутствии уксусной кислоты фермент может быть разложен на неактивный белок и протетическую группу.

С целью выяснения химической структуры протетической группы глюкозооксидазы Кейлин и Хартри специально провели очень интересные опыты [18]. В очищенных препаратах оксидазы *d*-аминокислот они отделили белок от протетической группы, которая является аллоксазинадениндинуклеотидом. Затем они воспроизвели оксидазу *d*-аминокислот из белковой части оксидазы *d*-аминокислот и прибавленного стандартного раствора аллоксазинадениндинуклеотида, содержащего 0,65 мг/мл рибофлавинфосфата, и определили активность смеси манометрическим способом по скорости окисления *d*-аланина. Вслед за этим Кейлин и Хартри воспроизвели фермент, используя белок оксидазы *d*-аминокислот и протетическую группу нотатина. Каталитическая активность воспроизведенного таким путем фермента оказалась тождественной активности при воспроизведении фермента из белка оксидазы *d*-аминокислот и стандартного раствора аллоксазинадениндинуклеотида. Это послужило доказательством того, что протетической группой глюкозооксидазы является аллоксазинадениндинуклеотид.

Кейлин и Хартри установили [19], что при добавлении глюкозы к раствору глюкозооксидазы последняя почти полностью обесцвечивается и характерные полосы в спектре абсорбции при 377 *mμ* и 455 *mμ* становятся еле заметными вследствие редукции аллоксазинового кольца. При встряхивании на воздухе аллоксазиновое кольцо опять окисляется и вновь появляется характерный цвет фермента и полосы в абсорбционном спектре. Из величины абсорбционного коэффициента при 455 *mμ* Кейлин и Хартри вычислили, что минимальный молекулярный вес нотатина равен 75 000. Молекулярный вес, вычисленный по скорости осаждения и постоянной диффузии, равен 152 000 и свидетельствует о наличии в молекуле фермента двух протетических групп. Поведение большинства активных препаратов фермента

в ультрацентрифуге показало, что чистота препаратов составляет 80—90%.

Согласно их данным, фермент не флуоресцирует в ультрафиолете при величинах рН, находящихся в пределах его каталитической активности (2—8). За пределами этой величины рН фермент теряет свою активность и начинает флуоресцировать. Они также показали резко выраженную специфичность глюкозооксидазы по отношению к глюкозе [19]. Из 50 проверенных сахаров и их производных только *d*-манноза, *d*-ксилоза, 6-метилглюкоза и 4,6-диметилглюкоза окислялись препаратами глюкозооксидазы со скоростью около 1% скорости окисления глюкозы.

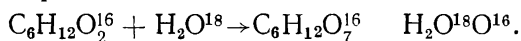
При изучении активности глюкозооксидазы по отношению к *d*-альдогексозам [20] было установлено, что если активность по отношению к *d*-глюкозе принять за 100, то относительная скорость окисления других гексоз такова: для маннозы — 0,98, альтрозы 0,16, галактозы — 0,14. Другие совсем не поддаются действию фермента.

Эти авторы подтвердили данные Бентлей и Нейбергер [21] о стереоспецифичности глюкозооксидазы и показали [20], что скорость окисления двух изомеров глюкозы выражается отношением $\beta/\alpha = 100/0,64$. Высокую активность глюкозооксидазы к глюкозе, наблюдаемую в опытах Бентлей и Нейбергер, Кейлин и Хартри объяснили тем, что мутаротация α -формы в β -форму происходит так же быстро, как и окисление *d*-глюкозы. Ими было также установлено, что цитохромная система не участвует во внутриклеточном окислении глюкозы в глюконовую кислоту (внутреннее дыхание мицелия чувствительно к циану, а окисление глюкозы не тормозится цианом).

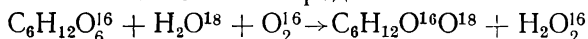
Принадлежность глюкозооксидазы к флавопротеинам, которые являются дегидразами, поставило вопрос о том, каким образом фермент катализирует окисление глюкозы: катализируя перенос двух атомов водорода от глюкозы или гидратно-альдегидной формы глюкозы на молекулярный кислород, являющийся акцептором водорода, или активацией молекулярного кислорода, в результате чего один из кислородных атомов соединяется с альдегидной группой глюкозы, в то время как другой атом реагирует с водой, образуя перекись водорода.

Для выяснения механизма действия глюкозооксидазы

Бентлей и Нейбергер [21] провели опыты, в которых применяли изотопный молекулярный кислород и воду с изотопным кислородом (O^{18}). Применяя H_2O^{18} и O_2^{16} , авторы ожидали, что в том случае, если глюкозооксидаза будет действовать как оксидаза, кислород, выделяющийся при разрушении H_2O_2 , должен содержать $1/2$ изотопного кислорода, содержащегося в воде, примененной в качестве растворителя:



В том же случае, если в этой реакции газообразный кислород явится акцептором водорода, H_2O_2 не должен содержать изотопного кислорода:



Результаты проведенных опытов показали, что отщепляемый от глюкозы водород переносится через флавопротеин на газообразный кислород. К таким же результатам привели опыты с применением O_2^{18} и H_2O^{16}

Этими опытами было доказано, что действие глюкозооксидазы является дегидразным: отщепляя водород от глюкозы, аллоксинадениндинуклеотид гидрируется, а затем гидрированный флавопротеин отдает водород кислороду, восстанавливая последний до перекиси водорода.

Весьма существенным оказался еще один вывод Бентлей и Нейбергера. Сравнивая окисление глюкозы глюкозооксидазой и развитие кислотности (вследствие накопления глюконовой кислоты), авторы показали, что первым продуктом энзиматической реакции является нейтральное вещество. Поляриметрические исследования дали возможность идентифицировать это вещество как δ -глюконолактон, который дальше неэнзиматическим путем превращается в глюконовую кислоту. Эти данные позволили авторам заключить, что субстратом действия глюкозооксидазы (нотатина) является глюкопираноза, а не свободный альдегид или его гидрат, или одна из двух глюкофураназ, так как в противном случае первым продуктом окисления должна была быть соответственно глюконовая кислота и γ -лактон.

Наконец, следует остановиться на работе японских авторов Кусаи и др. [22, 23]. Эти авторы в 1960 г. получили глюкозооксидазу в кристаллическом виде из культуральной жидкости нового вида гриба *Penicillium*

amagasakiense. Кусаи и сотрудники изучили коллекцию свыше 1200 штаммов грибов, выделенных из различных природных субстратов. Они описали новый вид пеницилла *P. amagasakiense* — активного продуцента фермента глюкозооксидазы. Гриб выращивался при глубинном и поверхностном методах; наиболее пригодной оказалась среда Чапека с 4,5% сахарозы. При выращивании на среде с глюкозой активность образований глюкозооксидазы могла, как указывают авторы, быть удовлетворительной при условии регулирования рН среды во время культивирования гриба. Пригодность сахаров в среде Чапека для образования глюкозооксидазы следующая: сахароза→глюкоза→манноза→галактоза→лактоза. Наилучшим рН для начала образования глюкозооксидазы считают равным 5,5—6,0.

Метод японских авторов для получения очищенных и кристаллических препаратов глюкозооксидазы из *P. amagasakiense* включает трехкратную адсорбцию с последующей элюцией на колонках с разными смолами, высаливание серноокислым аммонием, диализ, кристаллизацию и перекристаллизацию. Авторы изучали физико-химические и ферментативные свойства полученных препаратов.

Кусаи и сотрудники подтвердили ряд свойств, установленных на препаратах нотатина, пенатина, пенициллина В. Растворы кристаллической глюкозооксидазы давали спектр абсорбции с тремя максимумами: при 278, 370 и 460 $m\mu$. Прибавление глюкозы к водным растворам глюкозооксидазы приводило к исчезновению пиков при 380 и 460 $m\mu$ и к смещению пика при 380 $m\mu$ до 273 $m\mu$. Прибавление натрий-дитионина также приводило к исчезновению пиков при 380 и 460 $m\mu$.

Электрофоретические исследования показали, что кристаллические препараты являются гомогенными. Анализ с помощью ультрацентрифуги также показал гомогенность препаратов. Константа седиментации оказалась равной $7,93 \cdot 10^{-13}$ сек. Также была измерена константа диффузии (при начальной концентрации энзима она была равна $5,02 \cdot 10^{-7}$ $cm^2/сек$). На основании данных константы седиментации и диффузии было высчитано, что молекулярный вес равен 154 000 и одна молекула глюкозооксидазы содержит две молекулы ФАД. Изoeлектрическая точка, высчитанная на осно-

вании измерений в электрофоретическом аппарате, оказалась равной 4,35; оптимум рН при 5,6—5,8. Было показано также, что энзим стабилен при рН 4,0—6,0 и температуре 40°. Прибавление глюкозы увеличивает тепловую стабильность.

В атмосфере 100% кислорода активность фермента была приблизительно в три раза выше, чем в атмосфере воздуха. Также показана высокая специфичность кристаллических препаратов глюкозооксидазы по отношению к глюкозе. Новыми в работе этих авторов, по сравнению с другими исследованиями, посвященными этому ферменту, были данные о тормозящем действии SH-ядов, таких, как парахлормеркурийбензоат (РХМБ) HgCl_2 , AgCl и CuSO_4 , что свидетельствует о том, что глюкозооксидаза, подобно другим флавиновым ферментам, для своей активности требует SH-групп.

Активность глюкозооксидазы, согласно данным Ку-саи, тормозится также такими карбонильными реактивами, как гидроксилламин, гидразин, фенилгидразин, Na-бисульфит и димедон. Торможение димедона не является конкурентным (для глюкозы).

Ку-саи и сотрудники также исследовали возможность переноса водорода не на кислород, а на другие акцепторы. Оказалось, что лучшим акцептором является 2,6-дихлорфенолиндофенол, однако скорость окисления глюкозы глюкозооксидазой в присутствии краски составляет 3,3% такового в присутствии кислорода.

В то же время они показали, что после отделения апоэнзима в нативном состоянии можно реконструировать либо вновь ФАД — энзим, который специфически переносит водород на кислород, либо моонуклеотид (ФМН) — фермент, который может окислять глюкозу только в присутствии 2,6-дихлорфенолиндофенола. Кроме того, показано, что при отделении белковой части глюкозооксидазы в присутствии 80%-ного раствора сульфата аммония и рН 2 она несколько модифицируется и апоэнзим может реконструироваться с шестью молекулами флавина. Этот фермент, как и ФМН, активен с красками, но не с кислородом.

Чехословацкие исследователи Мунк, Паскова и Ганус [140] разработали условия глубинного культивирования гриба *Asp. niger* — K_{10} с целью получения глюкозооксидазы из мицелия. Для выращивания гриба ав-

торы предложили видоизмененную среду Мюллера, которая позволила повысить продукцию глюкозооксидазы на 50—100% по сравнению с продукцией в исходной среде. Глюкозооксидазная активность мицелия определялась манометрически.

Для получения препарата глюкозооксидазы мицелий измельчался на шаровой мельнице с определенным объемом воды и из полученного экстракта глюкозооксидаза осаждалась полуторным объемом этилового спирта. Осадок отделялся и высушивался. Для дальнейшей очистки Ганус и Мунг [141] применили хроматографию на колонке ДЕАЕ. При повторной хроматографии на колонке ДЕАЕ им удалось получить фракцию, содержащую глюкозооксидазу и не содержащую каталазы.

Таким образом, литературные данные, приведенные в этой главе, свидетельствуют о том, что ряд грибов — *Penicillium notatum*, *P. amagasakiense*, *Aspergillus niger* и др. — в процессе своей жизнедеятельности продуцируют фермент глюкозооксидазу. Культуральная жидкость многих из указанных грибов, содержащая глюкозооксидазу, обладает антибиотической активностью. Высокой антибиотической активностью и ферментативной активностью обладают и очищенные препараты глюкозооксидазы.

Различными исследователями установлено, что глюкозооксидаза является флавопротеином и простетическая группа ее представляет собой флавинадениндинуклеотид.

Установлено, что глюкозооксидаза катализирует окисление β -D-глюкозы за счет молекулярного кислорода с образованием перекиси водорода и δ -лактона глюконовой кислоты, который спонтанно превращается в глюконовую кислоту.

Приведены различные методы выделения и очистки глюкозооксидазы из культуральной жидкости. Однако из числа приведенных исследований только метод Кусаи [23] позволяет получить гомогенный препарат (кристаллический) этого фермента. Но метод Кусаи является сложным и выход кристаллического препарата — низким. Остальные препараты глюкозооксидазы (других авторов) являются менее чистыми и содержат каталазу.

Следует отметить, что в настоящее время ряд зарубежных фирм выпускает препараты глюкозооксидазы, однако методы их получения являются секретом фирм. Все выпускаемые препараты содержат каталазу.

ХАРАКТЕРИСТИКА ГРИБА *PENICILLIUM VITALE* — ПРОДУЦЕНТА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

В свое время [24] нами было испытано 15 видов грибов в отношении активности образуемых ими глюкозооксидаз и их антибактериального спектра. Наиболее активным в этом отношении оказался *Penicillium vitale*, глюкозооксидаза которого обладала также широким антибактериальным спектром. Этот антибиотик ферментной природы, образуемый указанным грибом, был назван микроцидом и после соответствующих испытаний в клиниках в 1950 г. был внедрен в виде нативного препарата в медицинскую практику как лечебное средство для наружного применения. За истекшие годы приобретен большой опыт успешного лечения им многих заболеваний человека и показания для его применения значительно расширились. В последнее время интерес к ферменту глюкозооксидазе значительно возрос. Открылись широкие перспективы применения его в медицине и как реактива, необходимого для лабораторной практики в клиниках и поликлиниках, для нужд пищевой промышленности и некоторых других отраслей народного хозяйства. За это время достигнуты также значительные успехи в получении высокоактивных штаммов *P. vitale* как продуцента глюкозооксидазы. Поэтому здесь уместно привести краткое описание гриба и его изменчивости в процессе культивирования на искусственных средах.

Penicillium vitale Pidoplitschko et Bilai [25]. Колонии на агаре Чапека с сахарозой вначале белые, затем зелено-голубые, распростертые, бархатистые или мелкопушистые, обычно с многочисленными желтоватыми каплями, с довольно широким краем, впоследствии приобретающие грязно-сероватый оттенок, на обратной стороне вначале соломенно-желтого цвета, затем желто-коричневые. Агар окрашивается в зеленоватый цвет. Конидиеносцы в виде боковых ответвлений гиф, обычно до 250—300 μ длины, 2—3,5 μ толщины,

гладкие, с двуярусными или одномутовчатыми верхушечными кисточками, в последнем случае иногда ближе к вершине, с одной веточкой, несущей тоже одно-

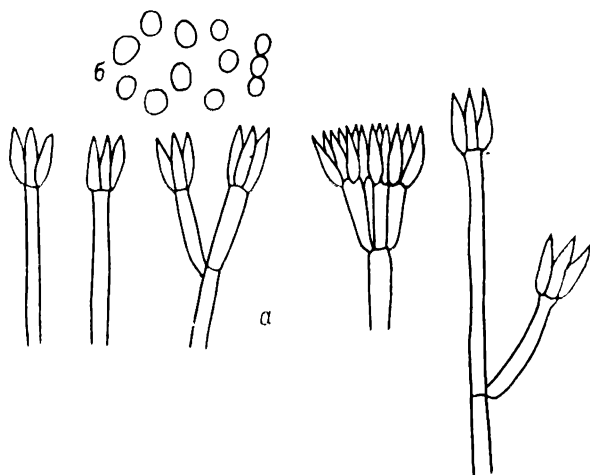


Рис. 1. *Penicillium vitale*:
а — конидиеносцы; б — конидии (увелич.).

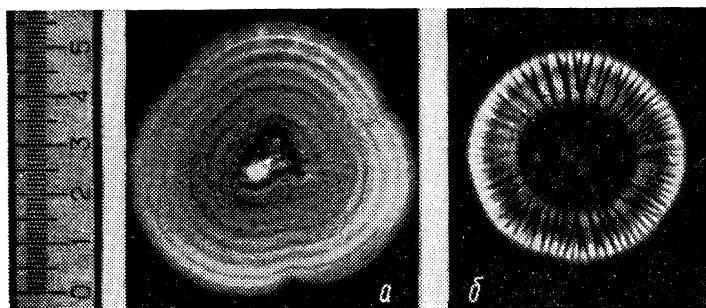


Рис. 2. Колонии *Penicillium vitale* на сусловом агаре:
а — дикая форма; б — культурная форма.

мутовчатую кисточку. Веточки обычно $10-15=2-3\mu$; метули $8-10=2-3\mu$, большей частью по 3—4; стеригмы бутылчатые, $6-8=2-2,5-3\mu$, по 2—5. Конидии в молодом возрасте эллиптические, чаще яйцевидные, затем широкоэллиптические, округлояйцевидные, $2,5-$

3=2—2,5μ, нередко более или менее шаровидные, 2,5—3μ, гладкие, в массе зеленые, в расходящихся или переплетающихся цепочках.

Колонии на сусловом агаре вначале белые, затем зелено-голубые, бархатистые или пушистые, довольно плотные, складчатые, с довольно широким белым краем, при старении приобретающие зеленовато-грязно-серую окраску, на обратной стороне вначале соломенно-желтого цвета, затем желто-коричневые, по краям желтые, в старом возрасте коричневые. Агар в процессе роста колоний постепенно окрашивается в зеленоватый цвет. На поверхности молодых колоний обычно образуются многочисленные желтоватые капли. Температурный максимум для роста гриба колеблется между 37—38° С.

Колонии на среде Чапека с желатиной (15%) и глюкозой ограниченно растущие, зелено-голубые, с преобладанием зеленых оттенков, бархатистые, с довольно широким белым краем, обычно с многочисленными желтоватыми каплями в конидиеносной зоне, впоследствии грязновато-серые, на обратной стороне оливково-корич-

Вид грибов	Конидиеносцы	Веточки	Метули
<i>P. chrysogenum</i> Thom	До 150—350 μ и более длины, 3—3,5 μ толщины	Обычно 15—25=3—3,5 μ	10—12=2—3 μ, иногда длиннее
<i>P. meleagrinum</i> Biourge	Большей частью 200—250=2,8—3,3 μ, реже 400—500 μ	Если имеются—10—20=2—3 μ	Большей частью 9—12=2—2,5 μ
<i>P. notatum</i> Westling	250—500=2,5—3 μ, иногда у некоторых штаммов 3—3,5 μ толщины	Если имеются—большей частью 10—15=2,5—3 μ	Обычно по 3—5; 9—16=2,5—3 μ
<i>P. cyaneofulvum</i> Biourge*	До 600—800 μ и более длины, 2,8—3,5 μ толщины	Если имеются—разной длины, 2,5—3 μ толщины	Обычно по 3—4; 8—15 μ, обычно 10—12 μ, у вершины большей частью расширенные
<i>P. vitale</i> Pidopl. et Bilai	Обычно до 250—300 μ длины, 2—3,5 μ толщины	Если имеются—10—15=2—3 μ	Обычно по 3—4, 8—10=2—3 μ

* Данные об этих четырех видах приводятся по монографии К. В. Raper and Ch. Thom «A manuel of the Penicillia», Baltimore, 1949.

Стеригм	Конидии
По 4—6, большей частью 8—10=2—2,5 μ	Эллиптические, реже почти шаровидные, большей частью 3—4=2,8—3,5 μ , иногда крупнее, обычно в хорошо выраженных колонках до 200 μ длины
По 6—8, около 7—9=1,8—2,2 μ	Эллиптические, 3—3,5=2,5—3 μ , в колонках до 200 μ длины
По 4—6, большей частью 8—10=2—3 μ со слегка усеченной верхушкой	Шаровидные или почти шаровидные, большей частью 3—3,5 μ , реже—несколько эллиптические, в цепочках 50—75 μ длины, переплетенных или в колонках
Обычно по 3—6; 7—10=2—2,5 μ	Шаровидные или почти шаровидные, большей частью 3—3,8 μ , в переплетенных или рыхло расположенных параллельных цепочках до 50 μ
По 2—5; 6—8=2—2,5—3 μ	Яйцевидные, округлояйцевидные, широкоэллиптические или более или менее шаровидные, 2,5—3=2—2,5 μ или 2,5—4 μ в диаметре, в расходящихся или переплетающихся цепочках

невые, по краям желтоватые, впоследствии темнеющие. Желатину окрашивает в оливковый цвет, разжижает со щелочной реакцией. *P. vitale* относится к группе *P. chrysogenum*. Приводим основные морфологические признаки видов этой группы.

Эти виды отличаются между собой и по культуральным признакам. *P. vitale* от *P. notatum* отличается тем, что он разжижает желатину со щелочной реакцией, в то время как *P. notatum* — с кислой реакцией. Интересно также отметить, что отдельные факторы, стимулирующие образование глюкозооксидазы *P. vitale*, не оказывают такого действия в отношении других видов этой группы. У диких форм *P. vitale* на агаровых средах конидии довольно однотипные, в преобладающем большинстве 2,5—3 μ в диаметре. У отдельных штаммов же, в результате длительного культивирования и отбора, шаровидные или широкоэллиптические конидии достигают иногда размеров до 4—4,5 μ в диаметре.

На первом этапе исследований по отбору активных штаммов *P. vitale* в отношении образования глюкозооксидазы производились высевы моноспоровых культур из колоний диких форм и сравнительное их испытание. Полученные более активные формы подвергались та-

кому же отбору с испытанием полученных моноспоровых культур. При выделении моноспоровых культур из одной и той же колонии у них наблюдалась значительная разница в их антибиотической активности. Однако при постоянных условиях выращивания гриба метод отбора моноспоровых культур, позволяющий достигнуть значительного повышения активности дочерних культур, по сравнению с исходными дикими, в дальнейшем требует все более длительного времени, чтобы получить даже относительно незначительное повышение активности. С этой целью потом были испытаны различные факторы, в том числе выращивание полученных штаммов в разных условиях. Лучшие результаты были получены при длительном выращивании культур гриба на средах, содержащих аланин или гликокол в качестве единственного источника азота. Полученные активные культуры и стали затем исходными для дальнейшей селекции активных штаммов и для производства микроцида (глюкозооксидазы). Одновременно с этим проводились работы по подбору плотных сред для выращивания посевного материала, так как это тоже имеет определенное значение для проявления активности гриба, и жидкой среды для выращивания гриба с целью получения глюкозооксидазы. Лучшей средой для выращивания посевного материала оказался сусловый агар, а лучшей жидкой средой для получения этого фермента оказалась синтетическая специально подобранная среда Билай. В этой среде созданы оптимальные условия для образования глюкозооксидазы грибом.

Таким образом, были получены многочисленные культуры гриба с разной активностью. По культуральным их признакам на сусловом агаре они могут быть разделены на следующие три группы.

Культуры со средней активностью спорообразования (на много меньшей, чем у диких форм), с плотной складчатой пленкой, с утолщенным краем. Образование конидий начинается позже на пять—восемь дней, чем у диких форм. Окраска конидиеносной зоны с преобладанием голубовато-зеленых оттенков (иногда также с легкими желтоватыми тонами), в старом возрасте приобретающая сероватые оттенки. Толщина гиф большей частью 2—3 μ . Гифы довольно густоветвистые. Конидии обычно 3—4 (4,5) μ в диаметре. Образование

конидий на среде Билай слабое. (У диких форм гифы слабоветвистые, обычно до 2 μ толщины, пленка и край тонкие, конидии обычно 2,5—3 μ , образуются в большом количестве)

Культуры со слабой активностью спорообразования, с плотной складчатой пленкой, с утолщенным краем. Конидиеносная зона в виде небольших очагов появляется поздно (примерно через две недели после посева). В остальном сходны с культурами предыдущей группы.

Культуры, дающие белую (иногда желтоватую) плотную складчатую пленку, с утолщенным краем, без заметной конидиеносной зоны, лишь с одиночными конидиями (бесцветными), обнаруживаемыми при просмотре препаратов под микроскопом. Гифы сильно и коротковетвистые, 3—5 μ , большей частью около 4 μ толщины, нередко с гигантскими клетками, обычно со скоплениями жира, на концах утолщены (по краям колонии). Край колонии, однако, в агар не вдавлен. Конидии обычно до 5 μ в диаметре, незначительная часть их — 3—3,5 μ в диаметре. Конидиеносцы в той или иной степени уродливые — метули и стеригмы утолщенные и в меньшем количестве, чем у нормальных культур.

Культуры аспорогенные с пленчатыми, морщинистыми колониями, тонкими, стекловидными, белого, затем сероватого цвета. Конидии почти отсутствуют, конидиеносцы большей частью одиночные, в сильной степени дегенерированные, в мицелии в значительном количестве имеются гигантские с каплями жира клетки. Этот тип культур был наименее многочисленен как при первоначальном выделении из моноспоровых изолятов, так и последующем рассеве субкультур.

Наибольшая часть высокоактивных культур по образованию микроцида (глюкозооксидазы) относится ко второй и отчасти третьей группе, однако третья группа для производства непригодна, так как затрудняет получение посевного материала. Более пригодными остаются культуры двух первых групп, хотя культуры второй группы имеют сильно выраженную тенденцию к потере способности к спорообразованию.

Остается невыясненным, почему посевной материал разного возраста дает пленку неодинаковой активности

в образовании глюкозооксидазы. Так, например, посевной материал из культуры трехмесячного возраста дает титр почти в десять раз больше, чем посевной материал из культур 15—20-дневного возраста при высеве его на жидкую среду.

Еще большая изменчивость культуральных признаков, полученных в лабораторных условиях штаммов *P. vitale*, наблюдается при выращивании их на агаровой среде Чапека.

Таким образом, в результате отбора моноспоровых изолятов *P. vitale* и измененных под воздействием различных, в той или иной степени мутагенных факторов и условий культивирования, т. е. путем многоступенчатого отбора, было получено несколько характерных типов культур с различной степенью изменения исходных признаков. Эти типы культур, отличающиеся не только культуральными и морфологическими признаками, но также антибиотической и ферментативной активностью, и явились материалом для дальнейшего изучения с целью отбора активных штаммов для получения микроцида [24] и глюкозооксидазы [32, 79, 80, 159, 160] при поверхностном и отчасти глубинном способе культивирования.

Полученные данные о связи морфологических признаков измененных штаммов с их физиологической активностью согласуются с данными других исследователей, изучавших изменчивость и проводивших селекцию активных штаммов у грибов продуцентов пенициллина, ферментов, органических кислот (Имшенецкий и сотр., 153, 154; Татаренко, 156; Двадцатова, 155; Брокская и др., 157, 158).

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗ У РАЗНЫХ ВИДОВ РОДА *PENICILLIUM* Lk.

Нашими прежними работами [24, 25] установлено, что глюкозооксидазная активность свойственна многим другим видам грибов рода *Penicillium* при культивировании их на предложенной нами среде с определенным соотношением источников углерода и азота и их повышенном содержании. Так, в числе видов, образующих антибактериальные глюкозооксидазы, нами были отмечены следующие: *P. chrysogenum*, *P. notatum*, *P. cyaneo-*

fulvum, *P. citrinum*, *P. casei*, *P. janthinellum*, *P. nigricans*, *P. kapuscinskii*, *P. lanosum*.

Антибактериальная активность культуральных жидкостей этих видов на среде Билай против *St. aureus* 209 была значительно выше при титровании на бульоне с глюкозой, чем на бульоне без нее. При определении глюкозооксидазной активности манометрическим методом в аппарате Варбурга было установлено, что фильтраты культур таких видов, как *P. janthinellum*, *P. kapuscinskii*, проявляют глюкозооксидазную активность, приближающуюся к активности нативного микроцида (потребление O_2 за 30 мин.— до 3000—5000 $мм^3/мл$). При этом у разных культур также не было отмечено прямой зависимости между степенью поглощения кислорода, выделения перекиси водорода, антибактериальной активностью и образованием глюконовой кислоты. Эти наблюдения, а также отличия в антибактериальном спектре культуральных жидкостей изучаемых видов пенициллов позволили нам предположить, что способность к образованию глюкозооксидаз свойственна довольно значительному числу видов пенициллов и что, по-видимому, эти ферменты, образуемые разными видами, могут не быть идентичными.

Преимущественное большинство изученных ранее видов пенициллов было изолировано нами из зерна хлебных злаков и кормов в различных районах страны. Оказалось, что как по активности биосинтеза глюкозооксидазы, так и по широте антибактериального спектра при культивировании в указанных условиях наиболее активным был *P. vitale*.

В настоящей работе нами (Билай, Пидопличко, Артемчук) приводятся краткие результаты сравнительного изучения глюкозооксидазной и антибиотической активности штаммов разных видов пенициллов, выделенных из почвы ризосферы сельскохозяйственных растений. Культуры изучаемых видов выращивались поверхностным методом на среде Билай в течение 10 дней. Определение глюкозооксидазной активности культуральной жидкости производилось манометрическим методом в аппарате Варбурга (в атмосфере воздуха) по активности связывания молекулярного кислорода, а также параллельно с этим иодометрическим методом по степени образования перекиси водорода (табл. 1).

Таблица 1

**Сравнительная глюкозооксидазная активность культур
разных видов пенициллов**

Еид и секция	Число испы- танных куль- тур	Активные культуры при определении			
		в аппарате Вар- бурга		йодометрическим методом	
		Число актив- ных	Колебания в уровне поглоще- ния O_2 за 30 мин. на 1 мл филь- рата, мл ³	Число актив- ных	Колебания в уровне выде- ления перекиси водорода из фильтрата, мл/мл
Monoverticillata					
<i>P. waksmani</i>	9	5	29—427	3	0,0—0,043
<i>P. implicatum</i>	2	0	—	1	0,0—0,102
<i>P. vinaceum</i>	8	3	10—183	5	0,0—0,034
<i>P. purpurogenum</i>	5	4	55—83	2	0,0—0,068
<i>P. adametzi</i>	6	5	37—234	3	0,0—0,204
<i>P. multicolor</i>	2	2	11—39	0	—
<i>P. fellutanum</i>	7	5	10—70	0	—
<i>P. roseo-purpureum</i>	9	9	22—211	4	0,0—0,068
<i>P. thonii</i>	4	3	9—45	1	0,0—0,034
<i>P. chermesinum</i>	4	3	138—356	0	—
Всего	56	39		19	
Asymmetrica					
<i>P. casei</i>	5	3	65—450	0	—
<i>P. notatum</i>	3	3	76—726	3	0,119—0,610
<i>P. cyaneofulvum</i>	2	2	65—154	2	0,119—0,610
<i>P. lanoso-coeruleum</i>	5	3	33—437	1	0,0—0,068
<i>P. puberulum</i>	3	0	—	2	0,0—0,102
<i>P. cyclopium</i>	8	0	—	3	0,0—0,040
<i>P. expansum</i>	4	0	—	2	0,0—0,068
<i>P. terrestre</i>	2	1	150	1	0,136
<i>P. stoloniferum</i>	6	4	10—126	4	0,0—0,068
<i>P. canescens</i>	3	0	—	0	—
<i>P. nigricans</i>	8	5	21—185	1	0,0—0,034
<i>P. lividum</i>	5	2	32—39	1	0,0—0,340
<i>P. palitans</i>	2	2	30—35	0	—
<i>P. restrictum</i>	3	2	37—296	0	—
Всего	59	27		20	
Biverticillata—Symmetrica					
<i>P. funiculosum</i>	8	5	173—631	6	0,0—0,068
<i>P. wortmanni</i>	5	3	10—140	2	0,0—0,034
<i>P. piceum</i>	5	0	—	3	0,0—0,034
<i>P. herquei</i>	4	4	43—444	4	0,068—0,136
<i>P. variabile</i>	2	2	36—44	0	—
<i>P. vitale</i>	24	14	600—2615	15	0,782—1,360

Как видно из данных табл. 1, из видов секции *Mo-poverticillata* наибольшей активностью как по числу штаммов, так и по глюкозооксидазной активности обладают виды *P waksmani*, *P adametzi*, *P roseo-purpureum*, *P chermesinum*. Низкой глюкозооксидазной активностью отличаются виды *P thomii*, *P fellutanum*, *P multicolor*, *P vinaceum*.

Из видов секции *Asymmetrica* после *P notatum*, который описан в литературе как продуцент глюкозооксидазы, сравнительно высокой активностью образования глюкозооксидазы отличались виды *P casei*, *P lanoso-coeruleum*, *P restrictum*. Неактивными в условиях наших опытов оказались штаммы видов *P puberulum*, *P cyclopium*, *P expansum*, *P canescens*.

Из испытанных штаммов видов секции *Biverticillata*—*Symmetrica* наибольшей активностью образования глюкозооксидазы обладали виды *P. funiculosum*, *P herquei*, неактивным оказался *P piceum*.

Проведенные опыты по изучению глюкозооксидазной активности разных видов пенициллов показывают, что биосинтез этого фермента свойственен значительному числу штаммов разных видов этого рода грибов. В то же время отдельные виды из испытанных нами не обладают глюкозооксидазной активностью, что может свидетельствовать или об их высокой каталазной активности, при наличии которой происходит быстрая инактивация глюкозооксидазы, или о том, что для этих видов не свойственен прямой путь окисления глюкозы. О различной системе окислительных ферментов, участвующих в окислении глюкозы у отдельных испытанных нами видов, в некоторой степени могут также свидетельствовать данные о числе активных штаммов, выявленных манометрическим и йодометрическим методами. Так, если общее число активных штаммов разных видов при определении манометрическим методом равно 79 из 139 испытанных, то при определении йодометрическим методом число активных равно только 54, при этом иногда различных. Обращает внимание весьма незначительное количество образованной перекиси водорода у большинства активных штаммов. Наиболее активными по количеству образованной перекиси водорода могут считаться отдельные штаммы таких видов:

P. adametzi, *P. notatum*, *P. cyaneofulvum*, *P. terrestre*, *P. herquei*.

Отмечены также различия антибактериальных свойств различных штаммов разных видов, активно образующих глюкозооксидазу.

Как известно, еще Сопп [143], который провел изучение каталазной активности разных видов пенициллов, отметил различия между отдельными видами и считал возможным использовать их в целях систематики. Наши данные показывают, что отдельные виды и их штаммы отличаются по способности к образованию глюкозооксидаз, отличающихся между собой некоторыми свойствами.

Приведенные данные требуют дальнейшего изучения.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОСИНТЕЗА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ ГРИБОМ *PENICILLIUM VITALE*

Рост и развитие микроскопических грибов, как и других микроорганизмов, в значительной степени зависят от условий культивирования и особенно от использования разных веществ как источников углеродного, азотного, витаминного и минерального питания. В настоящее время имеется значительное число опубликованных работ, выполненных с применением современных методов исследований, посвященных изучению различных аспектов метаболизма грибов. К их числу относится изучение характера взаимоотношений облигатных и факультативных паразитов с организмом-хозяином, изучение многообразных процессов разложения различных природных субстратов, биосинтеза многих веществ — ферментов, антибиотиков, витаминов, используемых в практике, и проч.

Физиологические исследования грибов — продуцентов антибиотиков, ферментов и других биологически активных веществ, могут быть характеризованы такими основными направлениями: изучение различных сторон метаболизма гриба-продуцента, связанных с образованием определенного метаболита при культивировании на однотипной, наиболее пригодной для данного процесса среде; изучение влияния различных стимуляторов, в том числе предшественников молекулы синтеза-

руемого вещества, на биосинтез активного начала в основном на фоне тех же условий культивирования; сравнительные исследования пригодности различных питательных сред для активности образования изучаемого метаболита, а также их экономичности при его производстве.

При изучении физиологии видов и штаммов грибов—продуцентов определенных метаболитов весьма желательным является установление условий культивирования продуцента, при которых биосинтез вещества был бы высок и относительно стабилен, с более ранним временем начала его образования. Не менее важным является также создание условий, при которых накопление синтезируемого вещества в культуральной жидкости было бы максимальным. Для последующей изоляции и очистки весьма приемлемыми следует считать условия культивирования гриба-продуцента, при которых биосинтез данного метаболита не сопровождался бы или по возможности в ограниченной степени был бы связан с биосинтезом его инактиваторов или других промежуточных метаболитов, снижающих активность образования и затрудняющих выделение и очистку.

При этом исследователь физиологии грибов не может не принять во внимание, что разным фазам развития грибного организма свойственен в той или иной мере специфический тип обмена веществ. Набухающим и прорастающим конидиям характерен иной комплекс ферментов, вызывающих определенные превращения веществ, мицелию гриба при основном обмене, сопровождаемом наиболее интенсивным использованием источников углерода и азота в среде и накоплением его биомассы,— другой комплекс ферментативных систем. Наконец, наступлению спорообразования, сопровождаемому нередко использованием продуктов собственного метаболизма, выделением и накоплением некоторых из них в мицелии и культуральной жидкости, также характерны определенные процессы обмена веществ.

Определенные изменения в химическом составе среды, мицелия и микроскопической структуре клеток отмечаются также и при погруженном методе культивирования, когда рост происходит в виде более гомогенной массы шариков мицелия [26, 27].

В отношении пенициллина как одного из наиболее

изученных метаболитов. *Penicillium* установлено, что он образуется как вторичный на фазе роста гриба, сопровождаемого почти полным усвоением углеводов и предшествующего автолизу мицелия: при этом до 98% антибиотика образуется в культуральной жидкости, остальное — в мицелии гриба.

Как видно из вышеприведенных литературных данных, фермент-антибиотик глюкозооксидаза, выделенный из разных штаммов *Penicillium* при культивировании их на среде Чапека—Докса, образуется обычно в раннем периоде роста гриба, сопровождаемом подкислением среды.

При изучении около 500 культур пенициллов, выделенных Пидопличко и Билай [28] из различных источников, были выделены культуры, отличающиеся от описанных в литературе морфологическими и культуральными признаками и описанные как новый вид *Penicillium vitale* Pidopl. et Bilai.

Были разработаны условия культивирования и проведена селекция активных штаммов продуцентов глюкозооксидазы с целью применения последней как лечебного средства и специфического фермента.

В связи с тем, что со времени опубликования работ по этому вопросу (1953 г.) до настоящего времени в литературе нет еще работ с аналогичным принципом подбора условий культивирования определенных видов пенициллов с целью направленного метаболизма в отношении образования глюкозооксидазы, интересно несколько подробнее осветить этот вопрос.

При проведении указанных исследований ставилась цель подобрать среду для культивирования *P. vitale*, в которой при высокой активности образования антибиотика — глюкозооксидазы было бы задержано конидиеобразование, отсутствовала пигментация культуральной жидкости и отсутствовал бы автолиз мицелия гриба. Авторы [28] руководствовались в значительной степени результатами исследований Костычева [29] по физиологии питания плесневых грибов и вышших растений, Буткевича [30] по физиологии питания микроскопических грибов, образующих органические кислоты, Прянишникова [31] по азотному питанию растений и др.

Этими и рядом других авторов, как известно, было

впервые установлено, что соотношение между источниками азотного и углеродного питания имеет важное значение в направленности процессов метаболизма растений. В наших опытах были испытаны различные варианты среды Чапека с источниками азота и углерода: сахарозой, лактозой, глюкозой, KNO_3 , аспарагином и аспарагиновой кислотой, гликоколом, аланином, мочевиной, пептоном в разных концентрациях и соотношениях друг с другом. В результате проведенных опытов было установлено, что как у селекционированного штамма *P. vitale* 1312/140, так и у диких культур этого вида при культивировании на среде с определенным соотношением нитратного азота и углерода при их повышенном содержании в ней (среде Билай) неизменно образуется сильно развитая мозговидноморщинистая пленка, отсутствует конидиеобразование и пигментация культуральной жидкости (до 15—20-дневного возраста культуры). При этом значительно повышалась антибактериальная активность культуральной жидкости против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий при титрации в присутствии глюкозы. Этот нативный раствор фермента был предложен в качестве наружного препарата под названием «микрочид» и в течение свыше десяти лет успешно применяется в медицинской практике.

Как показали дальнейшие исследования, культуральная жидкость *P. vitale* на предложенной нами среде (среда Билай) является благоприятным консервантом для фермента. Нативный раствор глюкозооксидазы (микрочид) не теряет антибактериальной активности при хранении в герметических условиях в течение многих лет, а в некоторых случаях она повышается.

Для получения фермента глюкозооксидазы Пидопличко, Билай, Никольской был селекционирован новый штамм *P. vitale* 1312/140 V — «глюкозооксидазный» из типа культур, полученных при первичном отборе активных штаммов, отличающихся сильно мозговидноскладчатой колонией, задержанным спорообразованием. С этим штаммом были также проведены опыты по изучению влияния различного соотношения источников углерода и азота в среде и их абсолютного содержания на антибиотическую и ферментативную активность.

С этой целью в колбы с 50 мл среды, содержащей

Таблица 2

Накопление биомассы *P. vitale* на средах с различным соотношением 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

10, 30, 60, 100 г/л глюкозы и при каждой ее концентрации 1, 3, 5, 10, 15 г/л KNO₃ (20 вариантов опыта), были в двух повторениях засеяны взвесью конидий одинаковой густоты штамма *P. vitale* 1312/140 V на сусловом агаре. По истечении десяти дней опыт был снят и учтен вес воздушно сухого мицелия, рН культуральной жидкости, наличие в ней каталазы, определяемое качественной пробой с H₂O₂, а также антибактериальная активность по отношению к *Staph. aureus* 209 при титрации на мясопептонном бульоне с 1% глюкозы и ферментативная активность манометрическим методом в аппарате Варбурга.

Результаты этих опытов приводим в табл. 2, 3, 4 и 5. Приведенные данные показывают, что принципиальные выводы о пригодности для активного образования антибактериальной глюкозооксидазы *P. vitale* сред с определенным соотношением источников углерода и их абсолютным содержанием, которые были сделаны на основании результатов прежних исследований (1950—1953 гг.), остаются в силе. Более того, используя предложенную среду, мы установили, что многие виды *Penicillium* способны образовывать антибактериальные глюкозооксидазы, отличающиеся по активности и, вероятно, другим свойствам.

Как видно из данных табл. 2, при содержании в среде 10 г глюкозы разница в накоплении биомассы *P. vitale* незначительна при разном содержании KNO₃ (от 1—15 г/л). При увеличении глюкозы в среде до 30 г/л значительно увеличивается накопление биомассы, особенно при увеличении KNO₃ от 1 до 3 г/л. При выращивании *P. vitale* на средах с содержанием глюко-

Таблица 3

Изменение pH культуральной жидкости *P. vitale* на средах с различным соотношением углерода и азота

Концентрация глюкозы, г/л	Концентрация KNO_3 , г/л									
	1		3		5		10		15	
	Исходное рН	Конечное рН	Исходное рН	Конечное рН	Исходное рН	Конечное рН	Исходное рН	Конечное рН	Исходное рН	Конечное рН
10	5,09	7,0	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

Таблица 4

Влияние различной концентрации глюкозы и соотношения с азотом в среде на антибактериальную активность *P. vitale* 1312/140

Концентрация глюкозы, г/л	Концентрация KNO_3 , г/л									
	1		3		5		10		15	
	Титр	Каталаза	Титр	Каталаза	Титр	Каталаза	Титр	Каталаза	Титр	Каталаза
10	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++
30	1/50	++	1/1000	++	1/1000	++	1/700	++	1/70	++
60	1/10	0	1/100	0	1/700	++	1/8000	++	1/8000	++
100	1/10	0	1/100	0	1/8000	+	1/16000	0	1/20000	++

Таблица 5

Влияние концентрации и соотношения источников углерода и азота в среде на ферментативную активность *Penicillium vitale* 1312/140 (O_2 мм³ на 1 мл за 30 мин.)

Концентрация глюкозы, г/л	Концентрация KNO_3 , г/л				
		3	5	10	15
10	302,4	0	0	0	0
30	210,9	2612,2	1894,3	3243	1903
60	0	196,7	2470	4096,0	3057,0
100	0	41,05	6529,2	7779,5	4090,9

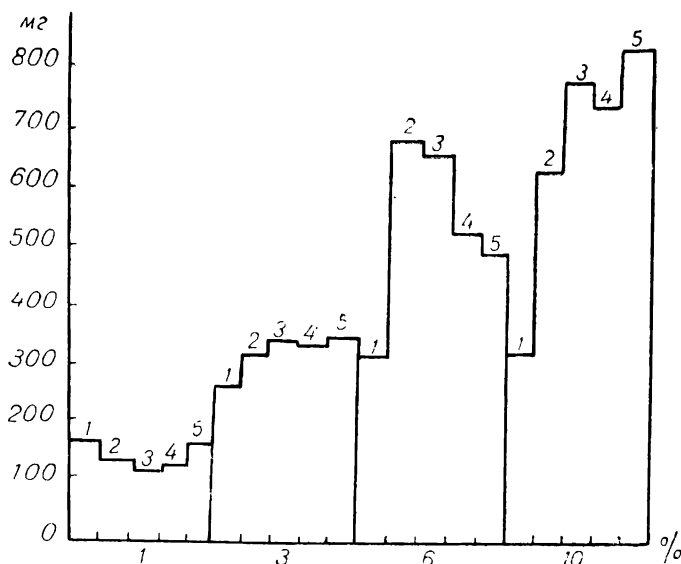


Рис. 3. Рост мицелия *P. vitale* 1312/140 V на средах с различным соотношением и содержанием источников углерода и азота (здесь и на рис. 2, 3, 4 1—5 — среды с разной концентрацией KNO_3 (%)):

1 — 0,1; 2 — 0,3; 3 — 0,5; 4 — 1,0; 5 — 1,5.

зы 60 г/л значительно увеличивается накопление биомассы также на среде с содержанием 3 г/л на этом уровне и при более высокой концентрации KNO_3 —5—15 г/л. Еще более увеличивается накопление биомассы

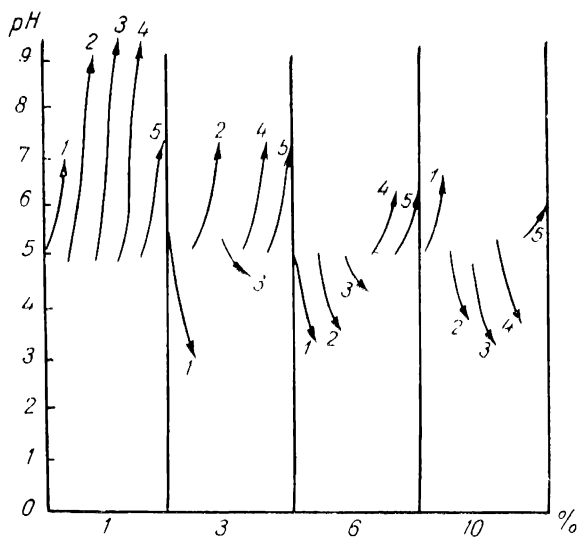


Рис. 4. Изменение pH культуральной жидкости *P. vitale* при росте на средах с различным содержанием и соотношением источников углерода и азота.

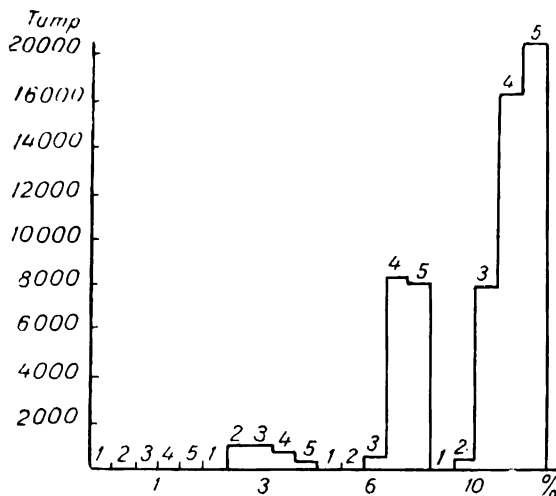


Рис. 5. Антибактериальная активность культуральной жидкости *P. vitale* в зависимости от состава питательной среды.

при повышении содержания глюкозы в среде до 100 г/л и 5 г/л KNO_3 . Таким образом, приведенные данные показывают, что путем подбора концентрации источника углерода и соответствующей ему концентрации источника азота в питательной среде возможно значительно увеличить накопление биомассы гриба (рис. 3, 4, 5, 6).

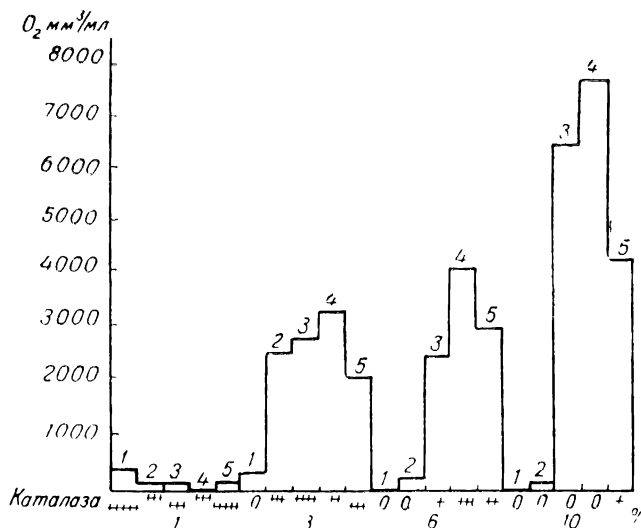


Рис. 6. Глюкозооксидазная активность культуральной жидкости *P. vitale* в зависимости от соотношения источников азота и углерода.

Приведенные данные показывают, что при незначительной концентрации источников азота в среде и, соответственно, слабом росте мицелия культуральная жидкость *P. vitale* не обладает антибактериальными свойствами (табл. 4). При определенном повышении содержания глюкозы и KNO_3 антибактериальная активность повышается в зависимости от уровня и соотношения этих веществ в питательной среде. Однако наибольшая активность отмечается при высоком содержании глюкозы и азотнокислого калия, в пределах их соотношения 1 10, 1,5 10. При этом культуральная жидкость почти не содержит каталазы, т. е. последняя не обнаруживается качественной пробой с 5% H_2O_2 . Как видно из табл. 2, при недостатке азота рН культу-

ральной жидкости (1—3 г/л) на средах с 30, 60, 100 г/л глюкозы колеблется от 3,28 до 3,47, т. е. совпадает с рН, оптимальным для образования глюкозооксидазы, однако ферментативной и антибактериальной активности в этих условиях не отмечено.

Приведенные в табл. 5 данные позволяют сделать три вывода. Во-первых, как при недостатке азота и избытке глюкозы, так и наоборот, при избытке азота и недостатке глюкозы отмечается низкая глюкозооксидазная активность культуральной жидкости *P. vitale*. Во-вторых, глюкозооксидазная активность культуральной жидкости проявляется при определенном соотношении источников углерода и азота в среде. В-третьих, наибольшая глюкозооксидазная активность культуральной жидкости *P. vitale* была отмечена при выращивании гриба на среде, содержащей не только в определенном соотношении источники углерода и азота, но и их повышенную концентрацию. Мы считаем также, что последнее обстоятельство имеет существенное значение для предотвращения процессов автолиза мицелиальной пленки гриба и в связи с этим общей направленности его метаболизма.

Таким образом, проведенные нами исследования позволили установить определенные закономерности в направленности процессов метаболизма *P. vitale*, связанных с биосинтезом антибактериальной глюкозооксидазы в зависимости от соотношения и концентрации источников углерода и азота в питательной среде. Результаты этих исследований явились необходимыми для практических рекомендаций при производстве нативной и очищенной глюкозооксидазы.

Сравнительные опыты по культивированию *P. vitale* на средах с глюкозой и сахарозой показали полную пригодность сахарозы и обычного сахара для биосинтеза глюкозооксидазы [18].

Было установлено, что *P. vitale* характеризуется интенсивной продукцией не только глюкозооксидазы, но и фермента инвертазы. Как показано работами Никольской, Закордонец и др., инвертазная активность *P. vitale* при культивировании на среде с сахарозой проявляется с момента начала прорастания конидий гриба (4-часовая культура), сахароза полностью инвертируется в 3—4-дневном возрасте культуры гриба [32]. Результаты опы-

Таблица 6

Антибактериальная и ферментативная активность культуральной жидкости *P. vitale* 1312/140 V на средах с глюкозой и сахарозой

Возраст культуры в днях	Вес мицелия, мг/мл		pH		Максимальное разведение, задерживающее рост <i>Staph. aureus</i> 209, мм ²		Глюкозоокисная активность (потребление O ₂ за 20 мин. на 1 мл)	
		С				С	Г	С
1	0,0015	0,0020	4,35	4,57	0	0	0	23,9
2	0,0061	0,0040	3,8	3,8	0	0	9,45	108,6
3	0,0090	0,0047	3,53	3,63	1/10000	1/4000	591,7	478,0
4	0,0123	0,0066	3,53	3,71	1/10000	1/10000	519,7	519,1
5	0,0133	0,0071	3,45	3,63	1/16000	1/10000	880,9	619,4
6	0,0142	0,0097	3,45	3,45	1/20000	1/20000	877,3	661,5
7	0,0145	0,0115	3,36	3,28	1/10000	1/24000	555,3	918,0
8	0,0151	0,0133	3,28	3,36	1/8000	1/24000	583,9	1114,7

* Г—глюкоза, С—сахароза.

Таблица 7

Наличие сахаров в культуральной жидкости *P. vitale* 1312/140 V на средах с глюкозой и сахарозой (восходящая бумажная хроматография)

Возраст куль- туры в днях	Наличие сахаров на среде с									
	глюкозой				сахарозой					
	Ф	С	Неопределен- ные сахара		Г	Ф	С	Неопределен- ные сахара		
			Альдо- гексо- зы	Кето- гексо- зы				Альдо- гексо- зы	Кето- гексо- зы	
1	++++	—	—		+		+	++++	+	+
2	++++	+	—		+	++	++	+++	—	+
3	++++	—	—		+	++++	++++	+		++
4	++++	+	—		+	++++	++++	—		—
5	++	—	—		—	++	++++	—		
6		+	—			++	++++	—	—	
7		+	—			++	++++	—	—	
8	++++	—	—			+	++++	—	—	

** Г—глюкоза, С—сахароза, Ф—фруктоза.

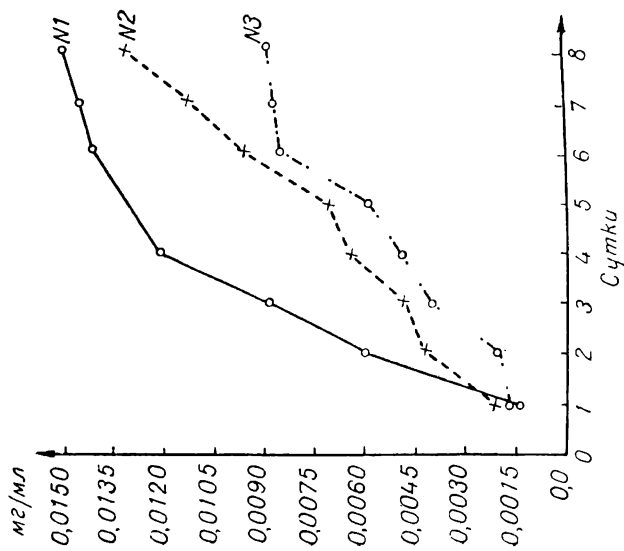


Рис. 7. Прирост биомассы гриба *P. vitale* в граммах (здесь и на рис. 6, 7, 8 № 1 — среда с глюкозой; № 2 — среда с сахарозой; № 3 — среда с сахаром).

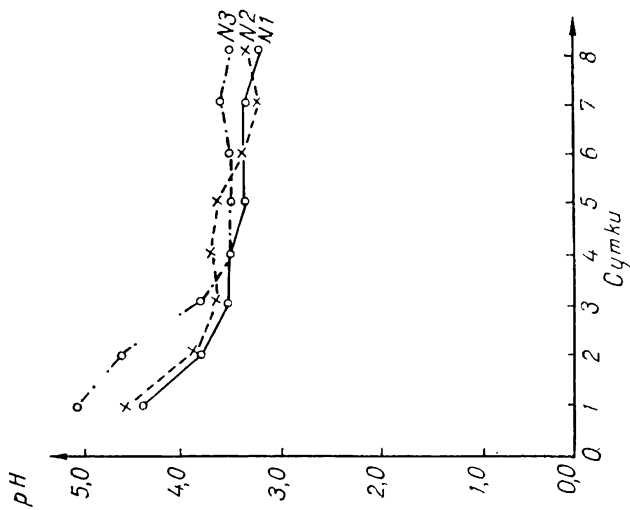


Рис. 8. Изменение pH среды в период выращивания *P. vitale*.

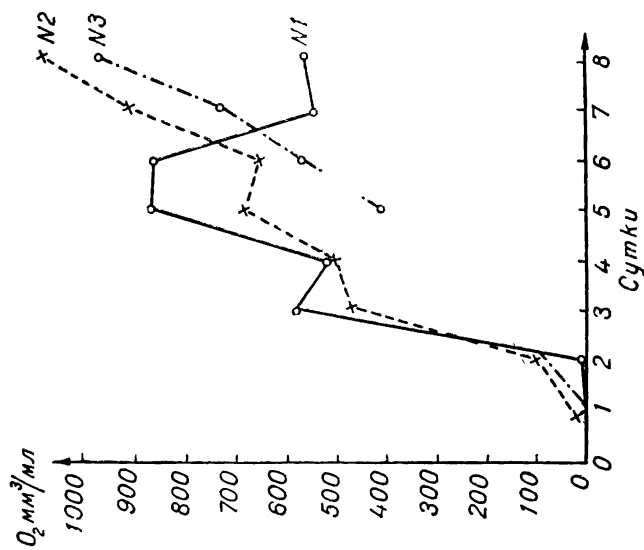


Рис. 10. Динамика глюкозооксидазной активности *P. vitale*:
1 — на среде с глюкозой; 2 — на среде с сахарозой; 3 — на среде с сахаром.

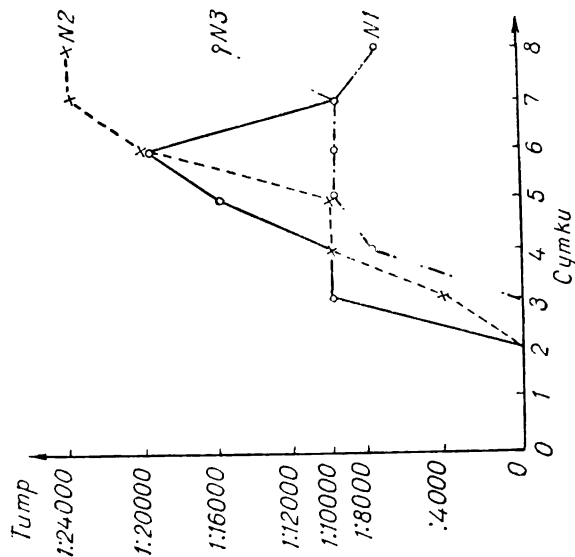


Рис. 9. Динамика антибактериальной активности *P. vitale*:
1 — на среде с глюкозой; 2 — на среде с сахарозой; 3 — на среде с сахаром.

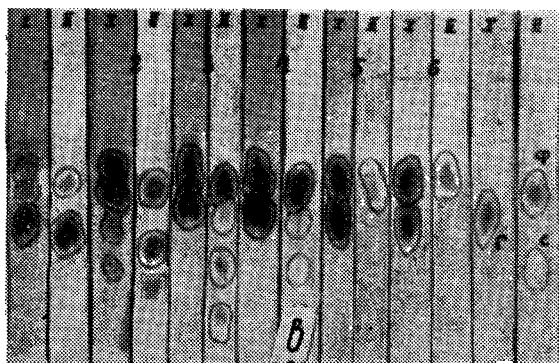
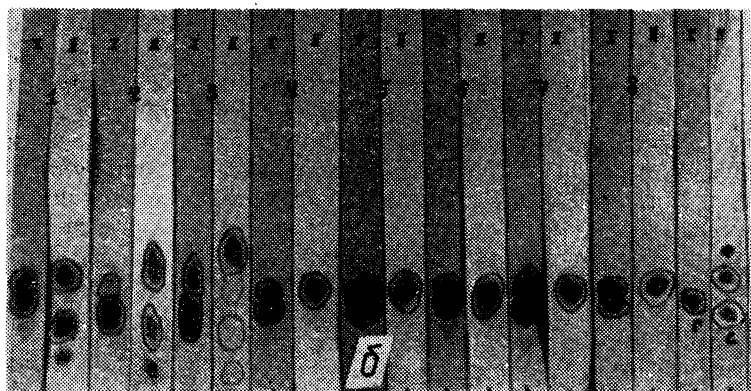
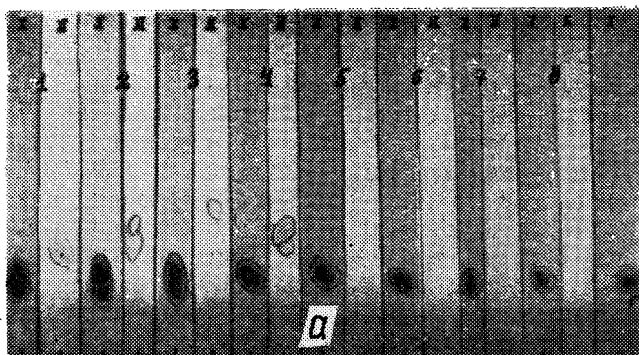


Рис. 11. Хроматографическое исследование сахаров в культуральной жидкости *P. vitale* в процессе биосинтеза глюкозооксидазы:
 а — среда с глюкозой; б — среда с сахарозой; в — среда с пищевым сахаром.
 I — альдогексозы; II — кетогексозы. 1, 2 и т. д. — дни проведения опыта. Мет-
 чики; Г — глюкоза; Ф — фруктоза; С — сахароза.

тов по динамике антибактериальной и ферментативной активности *P. vitale* на средах с глюкозой и сахарозой при поверхностном методе выращивания и данные о наличии в культуральной жидкости сахарозы, глюкозы, фруктозы приводим в табл. 6, 7 и рис. 7, 8, 9, 10, 11.

Приведенные данные показывают, что для накопления биомассы гриба, особенно в первый период его роста, глюкоза является более пригодным источником углерода, чем сахароза. К 7—8-дневному возрасту культуры гриба эта разница значительно нивелируется. В соответствии с этим на среде с глюкозой максимум антибактериальной и ферментативной активности наступает раньше, чем на среде с сахарозой.

В абсолютном выражении антибактериальная и ферментативная активность культуральной жидкости *P. vitale* на среде с сахарозой более высокая, чем на среде с глюкозой, что, вероятно, не может быть связано с инверсией последней и образованием глюкозы и фруктозы. Как видно из табл. 7 и рис. 11, при культивировании *P. vitale* на среде с глюкозой последняя в уменьшающемся количестве обнаруживается на протяжении 8-дневного возраста гриба и до 4-дневного возраста отмечается наличие неидентифицированного сахара (кетозы), тоже уменьшающегося к четвертому дню. При культивировании на среде с сахарозой последняя в уменьшающемся количестве обнаруживается до 3-дневного возраста культуры гриба; в это время увеличивается содержание глюкозы и фруктозы (которые обнаруживаются с однодневного возраста культуры). К концу 8-дневного возраста содержание глюкозы заметно уменьшается, а фруктоза остается в культуральной жидкости в неизменяющихся количествах.

Инвертаза *P. vitale* к концу третьего дня полностью расщепляет сахарозу. Кроме этого, в культуральной жидкости при выращивании на сахарозе также обнаружены неидентифицированные сахара (альдогексоза и кетогексоза), которые располагались на полоске хроматографической бумаги, соответственно, ниже глюкозы и сахарозы на первый-второй день и выше сахарозы на третий день роста гриба [32]. Продуцент глюкозооксидазы *P. vitale* отличается от других видов *P. chrysogenum* не только морфологическими и культуральными признаками, но также определенной физиологической

**Сравнительная характеристика антибактериальных свойств
P. vitale 1312/140 и *P. chrysogenum* «Новый гибрид» (беж.)
 в зависимости от условий культивирования**

Еид и штамм гриба	Срок ферментации, в часах	Диаметр зоны задержки роста, мм										
		<i>Staph. aureus</i> 209	<i>Staph. aureus</i> 209 Р	<i>Mycob. B₆</i>	<i>Bac. subtilis</i>	<i>Bac. megatherium</i>	<i>Bac. mesentericus</i>	<i>Bac. mycoides</i>	<i>Bact. coli</i> 163	<i>Bact. proteus</i>	<i>Bact. pyocyaneum</i>	<i>Bact. prodigiosum</i>

Микроцидная среда

<i>P. vitale</i> 1312/140	72	16	23	20	13	2	2	8	9	10	15	10
<i>P. chrysogenum</i> «Новый гибрид» (беж.)	72	12	—	—	—	10	10	—	—	—	—	—

Пенициллиновая среда (с кукурузным экстрактом)

<i>P. vitale</i> 1312/140	72	6	—	—	—	13	8	—	—	—	—	—
<i>P. chrysogenum</i> «Новый гибрид» (беж.)	72	30	—	—	15	30	24	—	—	—	—	—

специфичностью. Сравнительная характеристика антибиотических свойств селекционированных штаммов *P. vitale* 1312/140 и *P. chrysogenum* «Новый гибрид» (беж.) при выращивании их на микроцидной и пенициллиновой среде приводится в работе Е. А. Никольской [33]. Грибы выращивались на круговой качалке в колбах емкостью 1 л, содержащих 150 и 300 мл питательной среды, в течение 72 часов. В качестве инокулюма использована 46-часовая культура из расчета 3—5% к объему среды.

Приведенные данные показывают, что глюкозооксидазная антибиотическая активность является специфическим признаком *P. vitale*. При выращивании этого вида и *P. chrysogenum* «Новый гибрид» (беж.) на пенициллиновой среде (табл. 8, 9) культуральная жидкость двух видов обладает антибиотическими свойствами только против грамположительных бактерий (спектр пенициллиновый). При выращивании же на микроцидной среде культуральная жидкость *P. chrysogenum* «Новый гибрид» (беж.) также задерживает рост только грамположительных, в то время как культуральная жидкость *P. vitale* 1312/140 задерживает рост как грамположительных, так и грамотрицатель-

Рост и антибиотическая активность *P. vitale* 1312/140 и *P. chrysogenum* «Новый гибрид» (без.) в зависимости от среды

Вид и штамм гриба	Микроцидная среда (рН=5,2)			Пенициллиновая среда (рН=6,1)		
	рН	Вес мицелия, мг/мл	Максимальное разведение, задерживающее рост <i>Staph. aureus</i> 209	рН	Вес мицелия, мг/мл	Максимальное разведение, задерживающее рост <i>Staph. aureus</i> 209
<i>P. vitale</i> 1312/140	3,3	11	1/10000	7,4	28	1/10
<i>P. chrysogenum</i> «Новый гибрид» (без.)	6,8	20,3	1/100	7,1	27,6	1/20000

ных бактерий (глюкозооксидазный спектр). Значительно позже к аналогичному выводу пришла Покровская при сравнительном изучении активности образования глюкозооксидазы разными видами пенициллов [34]. Представляют в этой связи также интерес данные о росте мицелия, изменении рН и активности этих двух видов грибов.

P. vitale 1312/140 только при росте на микроцидной среде подкисляет культуральную жидкость до 3,3, что сопровождается образованием глюкозооксидазы, в то время как *P. chrysogenum* «Новый гибрид» (без.) на двух средах подщелачивает их, а на пенициллиновой среде культуральная жидкость обладает значительной активностью против *Staph. aureus* 209. На этой же среде у *P. vitale* 1312/140 значительно увеличивается рост мицелия, достигая 28 мг/мл по сравнению с 11 мг/мл на микроцидной среде, но культуральная жидкость почти не обладает антибактериальной активностью. Приведенные данные позволяют предположить, что замедленный рост мицелия на микроцидной среде направленно влияет на процессы метаболизма гриба, сопровождаемые окислением глюкозы молекулярным кислородом.

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА АНТИБИОТИЧЕСКУЮ И ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ *PENICILLIUM VITALE*

Почти все процессы синтеза и превращения веществ осуществляются при помощи ферментов, в состав большинства которых входят микроэлементы.

Почвенные грибы, как и бактерии и высшие растения, используют для питания ряд микроэлементов: медь, марганец, молибден, цинк, кобальт, железо. Установлено, что грибы больше всего нуждаются в цинке и железе [27, 142].

Известно, что кобальт способствует росту грибов, актиномицетов и бактерий. Под влиянием кобальта повышается образование стрептомицина у *Streptomyces griseus*.

Рядом авторов показано, что биохимическая активность грибов зависит от цинка, который влияет на образование грибами органических кислот и антибиотиков [144].

По данным Фостера и Ваксмана, при недостатке цинка *Rhizopus nigricans* слабо использует углеводы, но увеличивает образование фумаровой кислоты [145].

Большинство работ по влиянию микроэлементов на рост и развитие гриба проведены с *Asp. niger*. Было показано, что незначительные количества цинка увеличивают массу мицелия более чем в 500 раз [146]. Позднее было установлено, что такие микроэлементы, как марганец [147], медь [148], молибден [149, 150] и галлий [151], необходимы для нормального роста *Asp. niger*. Было определено, что эти же микроэлементы необходимы для ряда других грибов.

Имеются интересные данные об участии молибдена в процессе усвоения нитратного азота (у зеленых растений и грибов) и влиянии меди на рост, спорообразование и пигментацию спор у грибов [27, 150, 152].

Колхард, Михаэлис и др. [10] изучали влияние меди, железа и цинка на продукцию нотатина при культивировании *Penicillium notatum* Westling. Микроэлементы добавлялись к основной среде, которая наряду с другими солями содержала 1,0 мг/л Fe, 0,1—0,2 мг/л Cu и не содержала цинка. Среда была разделена на шесть равных частей, и микроэлементы добав-

лялись из расчёта: а) контроль — микроэлементы не добавлялись; б) Fe — 2 мг/л; в) Cu — 4; г) Zn — 1; д) Cu — 4 и Fe — 2; е) Cu — 4, Fe — 2 и Zn — 1 мг/л.

Показано, что рост *P. notatum* был нормальным во всех колбах, но продукция нотатина в достаточном количестве отмечена в контроле и в тех колбах, куда добавляли Fe (б) и Cu и Fe (д); колбы, содержащие только Cu (в), продуцировали нотатин в низком титре, и в колбах, в которые добавляли Zn, продукции нотатина не было.

Никольская изучала влияние некоторых микро- и макроэлементов на антибиотическую и ферментативную активность продуцента глюкозооксидазы *Penicillium vitale*. Ею были испытаны цинк ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), кобальт ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и CaCO_3 в концентрациях от 0,5—2—3 мг/л до 15—40 мг/л при внесении их в среду Билай перед посевом *P. vitale*.

В процессе ферментации проводилось определение прироста биомассы, нарастание антибактериальной активности, изменение pH, характер антибактериального спектра и ферментативная активность культуральной жидкости экспресс-методом, позволяющим определять активность фермента по количеству образовавшейся перекиси водорода.

Полученные результаты свидетельствуют, что как при поверхностном, так и при глубинном культивировании гриба *P. vitale* выявилось угнетающее действие цинка во всех испытанных концентрациях (1, 3, 5, 10, 20 мг/л) на антибиотическую и ферментативную активность продуцента. Однако цинк положительно влиял на прирост биомассы. По сравнению с контролем увеличение сухого веса мицелия было порядка 3—5 мг/мл при поверхностном культивировании гриба и 2—3 мг/мл — при глубинном, когда цинк добавлялся в количестве 3, 5, 10 мг/л. Меньшие дозы цинка (1—2 мг/л) при глубинном культивировании приводили к незначительному снижению антибиотической активности, но ферментативная активность была намного ниже, чем в контроле.

Кобальт в количестве 5, 10, 20 мг/л при поверхностном культивировании гриба не оказал заметного влияния на биосинтез глюкозооксидазы, но при глубинной ферментации дозы кобальта в количестве 3, 5, 10 мг/л

**Влияние цинка, кобальта и железа на антибиотическую
и ферментативную активность *P. vitale* при поверхностном
методе культивирования**

Штамм гриба, возраст, плот- ность посева на 1 мл	Количество добавленного микроэлемента к среде	Время куль- тивиро- вания (в днях)	pH	Титр по отношению к <i>Staph. aureus</i> 209	Потребление O ₂ на 1 мл культуральной жидкости за 30 мин., мм ³	Вес сухого мице- лия, мг/мл
IV 2·10 ⁵ 4 мес.	ZnSO ₄ , 5 мг/л	8	3,88	1:4000	554,55	17
		10	3,8	1:4000	1503,44	16
	ZnSO ₄ , 10 мг/л	8	3,8	1:4000	246,47	17
		10	3,88	1:4000	1293,95	18
	Контроль	8	3,45	1:10000	2723,37	14
		10	3,45	1:10000	5077,20	13
IV 2·10 ⁵ 4 мес.	Co(NO ₃) ₂ , 5 мг/л	8	3,53	1:10000	4204,57	18
		10	3,36	1:10000	5693,36	14
	Co(NO ₃) ₂ , 10 мг/л	8	3,53	1:16000	4288,51	16
		10	3,45	1:20000	4226,89	17
	Контроль	8	3,45	1:10000	2723,37	14
		10	3,45	1:10000	5077,20	13
IV 2·10 ⁵ 4 мес.	FeSO ₄ , 10 мг/л	8	3,63	1:16000	4100,76	17
		10	3,45	1:16000	3996,48	13
	FeSO ₄ , 20 мг/л	8	3,53	1:16000	4120,79	16
		10	3,36	1:16000	4239,22	16
	FeSO ₄ , 40 мг/л	8	3,63	1:16000	3424,56	17
		10	3,36	1:10000	4017,40	15
	Контроль	8	3,45	1:10000	2723,37	14
		10	3,45	1:10000	5077,20	13

(особенно 3 мг/л) приводили к повышению титра культуральной жидкости по отношению к *Staph. aureus* 209 в два раза и к некоторому повышению ферментативной активности без увеличения прироста биомассы по сравнению с контролем.

Железо испытывалось в больших, по сравнению с другими микроэлементами, концентрациях (10—60 мг/л). Если при поверхностном культивировании гриба в присутствии повышенной концентрации железа отмечалось некоторое увеличение титра и прирост биомассы, то при глубинном выращивании гриба положительного влияния железа не отмечено (табл. 10, 11).

**Влияние цинка, кобальта и железа на антибиотическую
и ферментативную активность *P. vitale* при глубинном методе
культивирования**

Штамм гриба, воз- раст, плот- ность по- сева на 1 мл	Количество добавленного микроэлемента к среде	Число оборо- тов качал- ки	Время фермен- тации (в ча- сах)	pH	Титр по отношению к <i>Staph. aureus</i> 209	Погребле- ние O ₂ на 1 мл куль- туральной жидкости за 30 мин., мм ³	Вес сухого мице- лия, мг/мл		
IV—V 6·10 ⁴ 3,5 мес.	ZnSO ₄ , 3 мг/л	140	48	4,42	0	61,02	8		
			72	3,97	0	98,59			
	ZnSO ₄ , 5 мг/л		48	4,49	0	0	9		
			72	3,97	0	73,94			
	Контроль		48	3,28	1:4000	1750,76	6		
			72	3,11	1:10000	3470,56			
V 8·10 ⁴ 1,5 мес.	ZnSO ₄ , 1 мг/л	140	48	3,71	0	0	4		
			72	3,8	1:8000	246,4			
	Контроль		48	3,53	1:1000	1607,76	3		
			72	3,36	1:10000	1823,36			
	V 8·10 ⁴ 1,5 мес.		Co(NO ₃) ₂ , 3 мг/л	140	48	3,45	1:4000	1841,84	2
					72	3,19	>1:20000	2845,92	
Co(NO ₃) ₂ , 10 мг/л		48	3,45		1:4000	1540,0	2		
		72	3,19		1:10000	2722,0			
Контроль		48	3,53		1:1000	1607,76	3		
		72	3,36		1:10000	1823,36			
V 7·10 ⁴ 3 мес.	Co(NO ₃) ₂ , 3 мг/л	200	72	3,11	>1:24000	2941,48	6		
			72	3,19	1:20000	2192,96			
	Co(NO ₃) ₂ , 10 мг/л		72	3,19	1:10000	2416,0	6		
	Контроль		72	3,19	1:10000	2416,0			
	IV—V 6·10 ⁴ 3,5 мес.		FeSO ₄ , 20 мг/л*	140	48	3,45	1:4000	1651,32	5
					72	3,11	1:10000	2932,94	
Контроль		48	3,53		1:4000	1750,76	7		
		72	3,36		1:10000	3470,56			

* Аналогичные результаты получены при добавлении 30 и 40 мг/л FeSO₄·7H₂O.

Активирующее действие углекислого кальция особенно резко проявлялось при глубоинной ферментации *P. vitale*. Даже такие маленькие дозы, как 20—40 мг/л, приводили к повышению антибиотической ак-

Влияние CaCO_3 на антибиотическую и ферментативную активность *P. vitale* при глубинной ферментации

Штамм гриба, возраст, плотность посева на 1 мл	Количество добавленного микроэлемента к среде	Число оборотов качалки	Время ферментации (в часах)	pH	Титр по отношению к <i>Staph. aureus</i> 209	Потребление O ₂ на 1 мл культуральной жидкости за 30 мин., мм ³	Вес сухого мицелия, мг/мл
IV—V 6·10 ⁴ 3,5 мес.	CaCO ₃ , 20 мг/л	140	48	3,36	1:8000	2254,26	7
			72	3,28	>1:20000	4559,62	
	Контроль		48	3,28	1:4000	1750,76	7
			72	3,11	1:10000	3470,56	
V 8·10 ⁴ 1,5 мес.	CaCO ₃ , 20 мг/л	140	48	3,28	1:4000	2038,96	2
			72	3,19	1:16000	3560,48	
	CaCO ₃ , 40 мг/л		48	3,45	1:4000	1355,20	2
			72	3,36	>1:20000	4219,6	
	Контроль		48	3,53	1:1000	1607,76	3
			72	3,36	1:10000	1823,36	
V 7·10 ⁴ 3 мес.	CaCO ₃ , 20 мг/л	200	72	3,19	1:24000	4169,62	5
	CaCO ₃ , 40 мг/л		72	3,19	1:16000	3930,08	5
	Контроль		72	3,19	1:10000	2416,00	6

тивности культуральной жидкости в два раза по сравнению с контролем при значительном увеличении потребления кислорода (табл. 12)

Эти данные согласуются с ранее полученными результатами в Институте биохимии АН УССР и Институте микробиологии АН УССР [32, 33] о том, что определенные концентрации некоторых катионов Ca^{++} , Mn^{++} , NH_4^+ и анионов Cl^- повышают ферментативную и антибиотическую активность глюкозооксидазы как при добавлении к культуральной жидкости, отделенной от мицелия в конце ферментации, так и к растворам очищенных препаратов глюкозооксидазы.

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА
ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ
ИЗ *PENICILLIUM VITALE***

Как указано выше, в 1946 г. в Институте микробиологии АН УССР Пидопличко и Билай [25, 28] описали новый вид *Penicillium vitale*. При направленном культивировании этого гриба они наблюдали накопление в культуральной жидкости вещества, благодаря которому культуральная жидкость обладала антибиотической активностью. Авторы назвали это вещество микроцидом. Микроцид обладал высокой антибиотической активностью по отношению ко многим грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам, благодаря чему нашел широкое применение в лечебной практике (при лечении гнойных ран, ожогов, обморожений и т. п.) [35, 36].

В Институте биохимии АН УССР Сорени установил, что микроцид обладает высокой глюкозооксидазной активностью и разработал метод получения очищенных препаратов этого антибиотика [37]. Метод Сорени основан на осаждении глюкозооксидазы из культуральной жидкости серноокислым аммонием путем доведения концентрации последнего до 85 % насыщения (осадок выпадал за 3—4 дня), извлечении водой фермента из осадка, освобождении от каталазы, переосаждении ацетоном и высушивании в вакууме.

Сорени установил, что после полного осаждения из микроцида глюкозооксидазы вся ферментативная и антибиотическая активность оказывается связанной с осадком. Центрифугат был лишен как антибиотической, так и ферментативной активности. Эти исследования также показали, что при получении очищенных препаратов микроцида удаляется большое количество балластных белков, среди которых находится вещество, значительно тормозящее антибактериальное действие микроцида.

Дальнейшие исследования привели Сорени к выводу, что веществом, тормозящим антибактериальное действие нативного микроцида и удаляемым в процессе очистки, является фермент каталаза. Удаление последней приводит к тому, что активность полученных препаратов повышается в 30—200 раз по сравнению с исходными препаратами.

Очищенные препараты микроцида (глюкозооксидазы) обладали высокой антибиотической и ферментативной активностью. Антибиотическая активность их выражалась величиной 1 1 млн.—1 1 млрд. Ферментативная активность выражалась величиной Q_{O_2} порядка 100 000—200 000.

Изоэлектрическая точка при определении с помощью ацетатного буферного ряда для этих препаратов при подогревании до 78° С находится при рН 4,1—4,4.

На основании проведенных исследований Сорени сделал вывод, что очищенный микроцид (глюкозооксидаза) относится к флавопротеинам и состоит из специфического белка и простетической группы — флавинадениндинуклеотида [37].

Однако метод получения очищенных препаратов микроцида (глюкозооксидазы), разработанный Сорени, не получил положительной оценки при полупроизводственной проверке. При выпадении белка в течение 3—4-х дней наблюдалось частичное разложение осадка, появлялся запах сероводорода. Кроме того, в осадок вместе с глюкозооксидазой из культуральной жидкости осаждались все другие белки, и не от всех их удавалось освободиться при освобождении от каталазы (пятиминутное прогревание при рН 4 и 56° С).

Отрицательной стороной этих препаратов было и то, что они содержали большое количество сульфата аммония, который легко переходил в раствор вместе с ферментом и в осадок при переосаждении ацетоном. Исходя из этого Институту биохимии АН УССР было поручено разработать новый метод получения высокоочищенных препаратов микроцида (глюкозооксидазы) с учетом требований производства [38—41].

При разработке этого метода мы стремились к тому, чтобы он был сравнительно быстрым, простым, не требовал бы специального оборудования и больших количеств дефицитных реактивов. Учитывалась также возможность регенерирования применяемых реактивов и использования их многократно для очистки. Но главным требованием было получение ферментных препаратов глюкозооксидазы высокой чистоты без примеси других ферментных белков при минимальной потере фермента.

Метод получения сухих очищенных и кристаллических препаратов глюкозооксидазы

Разработанный нами метод основан на адсорбции фермента безводной окисью алюминия и последующей элюцией аммонийфосфатным буфером.

Адсорбция производится в адсорбере. Адсорбер заполняется культуральной жидкостью так, чтобы между жидкостью и крышкой оставалось минимальное количество воздуха. Этим достигается наименьшая аэрация, ведущая к инаktivации фермента.

Перед адсорбцией рН жидкости, предварительно отделенной от мицелия гриба и профильтрованной через свечи Шамберлана, доводят до 6,8—7,0 (с помощью 40% NaOH или KOH). Если титр культуральной жидкости равен 1 8000—1 10 000¹ и ферментативная активность культуральной жидкости выражается потреблением кислорода за 30 мин. (при 30° С и рН 5,8 в атмосфере кислорода) на 1 мл жидкости величиной 1500—2000 мм³, для полной адсорбции фермента необходимо прибавить 0,5 кг окиси алюминия на 10 л жидкости, т. е. 5%. При более высокой ферментативной активности культуральной жидкости, когда потребление кислорода на 1 мл жидкости за 30 мин. выражается величиной порядка 6000—8000 мм³ (и соответственно при антибактериальном титре, равном 1 24 000—1 50 000), для адсорбции фермента необходимо соответственно прибавить больше окиси алюминия (1—1,5 кг на 10 л культуральной жидкости, т. е. 10—15%²). Окись алюминия прибавляют равными порциями в четыре приема с 15-минутными перемешиваниями после каждого прибавления. Перемешивание обеспечивается механической мешалкой, вмонтированной в адсорбер. После окончания адсорбции окись алюминия с адсорбированным ферментом тщательно отделяется от жидкости фильтрованием при отсасывании.

Элюция фермента осуществляется в специальном сосуде, куда переносят адсорбент с адсорбированным на нем ферментом. Фермент элюируется при встряхи-

Титр показывает, в каком разведении жидкость тормозит рост золотистого стафилококка 209.

² Для адсорбции применяется безводная окись алюминия марки «Ч» или «ЧДА». Использованная окись алюминия регенерируется.

вании (120—130 встряхиваний в 1 мин.) адсорбента с элюирующей жидкостью. Элюцию проводят трехкратно. Для первой элюции применяют 9%-ный раствор хлористого аммония, приготовленный на 0,3 М растворе KH_2PO_4 ; вторую и третью элюции проводят 4,5%-ным раствором хлористого аммония, приготовленным на 0,15 М KH_2PO_4 . На 1 кг окиси алюминия прибавляют 400—450 мл элюата. Длительность каждой элюции — 20—30 мин. После окончания каждой элюции элюат отделяют от адсорбента путем фильтрования с применением воронки Бюхнера при отсасывании. Первый элюат всегда интенсивно желтого цвета, а два последующих — более светлые. Элюаты объединяют. Их объем составляет 1/20—1/10 часть жидкости, взятой для очистки (в зависимости от содержания фермента в жидкости и качества использованной окиси алюминия).

Осаждение фермента этиловым спиртом. К объединенному элюату, охлажденному до 0°C , добавляют при постоянном перемешивании на холоде двойной объем этилового спирта, охлажденного до -10°C . Смесь центрифугируют в охлажденных гильзах 8—10 мин. при 3000—4000 об/мин. Верхнюю жидкость сливают, а к осадку, содержащему фермент и примесь солей (NH_4Cl , KH_2PO_4), прибавляют небольшое количество ледяной дистиллированной воды и тщательно перемешивают. В этих условиях глюкозооксидаза легко переходит в раствор, а нерастворившийся осадок солей отделяют пятиминутным центрифугированием в охлажденных гильзах при 5000—6000 об/мин. Извлечение фермента из осадка небольшими порциями ледяной воды повторяют два-три раза и собранную верхнюю жидкость, содержащую фермент, объединяют вместе.

Осаждение и переосаждение фермента ацетоном. Из объединенного центрифугата (собранный жидкости), охлажденного до 0°C , глюкозооксидазу осаждают прибавлением к нему двойного объема ацетона, охлажденного до -10°C . Осадок фермента отделяют центрифугированием и верхнюю жидкость удаляют. Затем фермент извлекают из осадка, как и после осаждения спиртом, несколькими порциями ледяной дистиллированной воды, отделяя раствор фермента от осадка центрифугированием. Объединенный центрифугат (верх-

**Выход и активность очищенных препаратов глюкозооксидазы
из *P. vital***

Номер препарата	Дата получения	Выход препарата из 1 л культуральной жидкости		Характеристика препарата			
		мг препарата	мг белка	Титр	Q_{O_2}		% белка в препарате
					на 1 мг препарата	на 1 мг белка	
1	6.IV 1951	17,3		10^{-10*}	101736		
7	19.IV 1951	15,5		10^{-11}	65028		
9	23.IV 1951	12,7		$4 \cdot 10^{-11}$	91393		
16	5.V 1951	15,2		10^{-9}	77805		
21	16.V 1951	13,6		10^{-9}	46680		
39	7.V 1952	18,5		—	97432		
43	3.VI 1952	20,0		10^{-13}	138960		
45	22.V 1954	46,6		10^{-8}	112480		
49	1.IV 1961	52,0			140352		
51	27.VII 1961	42,0	—		126000	—	55
56	4.V 1962	130,0	70		114540	208255	
57	21.V 1962	160,0	64		82800	207000	40
58	6.VI 1962	101,0	43		72240	168000	43
60	3.IX 1962	60,6	57,2		249480	277200	90
61	18.IX 1962	60,0	49,4		170730	207200	82,4
67	6.III 1963	26,0		—	—	227610	90,0
70	6.IV 1963	88,0		$1:66000000$ (0,0388)	182350		
73	8.IV 1963	150,2	93,26		152244	251920	61,25
75	21.V 1963	82,3	75,4	—	179040	227300	80,0
76	8.VII 1963	82,0	70,5	$1:80000000$ (0,012)	224760	253393	86
78	27.VII 1963	82,3	64,9			204000	78

* В 1950—1954 гг. определение антибиотической активности препаратов глюкозооксидазы проводилось методом серийных разведений с использованием одной пипетки для их приготовления, поэтому титр был несколько выше по сравнению с титром 1955—1962 гг., когда каждое разведение готовилось отдельной пипеткой.

ную жидкость) вновь охлаждают до 0°C и к нему прибавляют двойной объем ацетона, охлажденного до -10°C . Осадок фермента отделяют центрифугированием. Верхнюю жидкость удаляют, а осадок растворяют в минимальном объеме ледяной воды, и водный раствор высушивают методом лиофильной сушки.

**Изменение ферментативной активности препаратов
очищенной глюкозооксидазы при хранении**

Номер препа- рата	Дата получения	Исходная активность Q_{O_2}	После хранения			
			Срок хранения	Актив- ность Q_{O_2}	Срок хранения	Активность Q_{O_2}
1	6.IV 1951	101736	1 год 8 мес.	102820	9 лет	8402
7	19.IV 1951	—	1 год 8 мес.	65028	12,5 лет	17838
31	19.IV 1951	—	—	—	12 лет	29568
46	12.V 1952	176596	—	—	6 лет	48960

Очищенные препараты глюкозооксидазы желтого цвета. Они легко растворяются в воде. Выход препарата из культуральной жидкости с титром 1 8000—1 10 000 составляет в среднем 15 мг из 1 л (препараты получены в 1951—1953 гг.) Из культуральной жидкости с более высоким содержанием в нем фермента (титр 1 : 24 000—1 50 000) выход препарата составляет 60—100 мг из 1 л, что соответствует 60—80 мг белка из 1 л культуральной жидкости (табл. 13).

Очищенные препараты глюкозооксидазы сохраняют свою активность длительное время (табл. 14). Например, препараты № 7 и № 31 через 12 лет еще остаются активными. Необходимо указать, что для получения очищенных препаратов глюкозооксидазы из культуральной жидкости *P. vitale* в указанных количествах и хорошей активности необходимо строго соблюдать рекомендованные условия выделения фермента. При соблюдении их различные авторы легко воспроизводили рекомендованный метод [122, 123, 124]. При нарушении рекомендованных условий очистки, естественно, не удается получить хороших результатов. Примером может служить работа Покровской и Воробьевой [136]. Эти авторы нарушили рекомендованные нами [38—41] условия адсорбции, использовали для адсорбции другую окись алюминия, исказили состав элюента и пришли к выводу о непригодности окиси алюминия (безводной) для адсорбции глюкозооксидазы из культуральной жидкости *P. vitale*.

Покровская и Воробьева [136] предложили свой метод получения препаратов глюкозооксидазы из культуральной жидкости *P. vitale*, *P. notatum*, *P. sp.*: к культуральной жидкости, содержащей мел (количество мела не указано), прибавляется четыре объема охлажденного спирта или ацетона. Выпавший осадок высушивается. Он содержит большое количество глюконата кальция и других примесей. Глюкозооксидазная активность такого препарата очень низка. Низкой является и его растворимость в воде. Далее фермент экстрагируют из осадка пятикратным объемом воды, центрифугируют. Водный экстракт подвергают длительному диализу (50 час.). Фермент осаждают ацетоном и высушивают из замороженного состояния в вакууме. Активность препаратов (лучших) выражается величиной Q_{O_2} , равной 10 000. Выход — около 300 мг из одного литра культуральной жидкости. Полученные таким методом препараты содержат каталазу (хотя авторы в указанной статье почему-то не сочли нужным отметить это)

Этот метод очистки глюкозооксидазы, как нам кажется, является мало пригодным, так как при рекомендованных авторами условиях осаждения фермента вместе с глюкозооксидазой в осадок выпадают и другие ферменты, и в частности каталаза. Дальнейшие этапы очистки не способствуют освобождению препарата от каталазы и других загрязнений; получаются препараты низкого качества.

Из культуральной жидкости гриба *P. vitale* по рекомендованному нами [38—41] методу получают препараты глюкозооксидазы, обладающие высокой ферментативной активностью (Q_{O_2} порядка 200 000), не содержащие каталазы (с высоким выходом препарата из 1 л культуральной жидкости (см. табл. 13).

Получение кристаллических препаратов глюкозооксидазы

Глюкозооксидазу в кристаллическом виде можно легко получить из водных растворов очищенной глюкозооксидазы с помощью сернокислого аммония при доведении его концентрации в растворе до 52—55% насыщения. Для этого к 2,5—3%-ному водному раствору

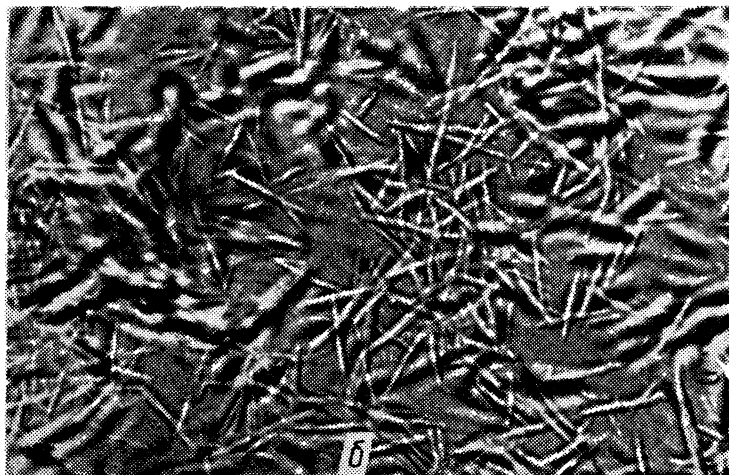
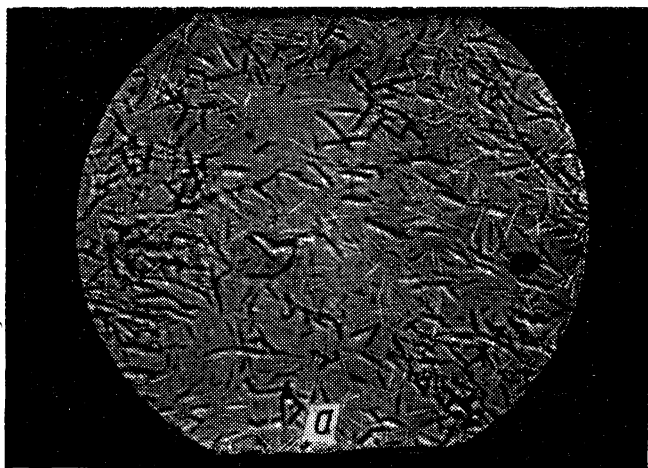
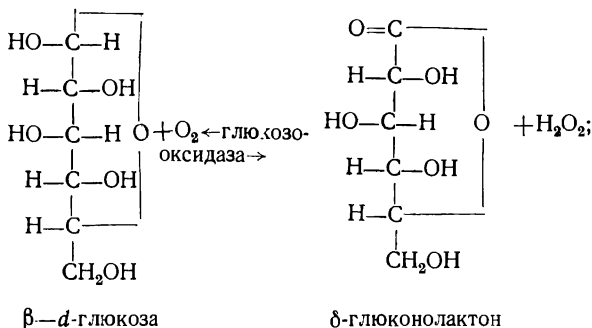


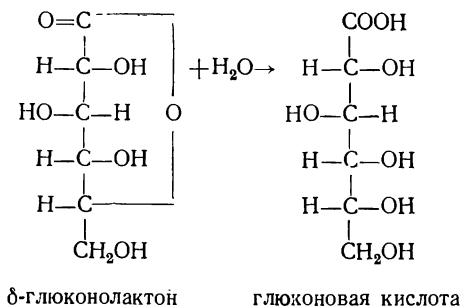
Рис. 12. Кристаллы глюкозооксидазы:
a — увеличено в 600 раз; *б* — увеличено в 1800 раз.

глюкозооксидазы медленно добавляют при перемешивании тонко растертый порошок сернокислого аммония до указанного насыщения (при достижении такого насыщения появляется небольшая стойкая муть) Кристаллизация протекает легче при комнатной температуре, чем при охлаждении, и наступает через 3—5 часов после доведения насыщения раствора сульфатом аммония до указанной концентрации. Кристаллы имеют вид тонких игл (рис. 12). С целью перекристаллизации фермента через 2—3 дня кристаллы глюкозооксидазы отделяют от маточного раствора центрифугированием (10 мин. при 7000—8000 *об/мин*), растворяют в дистиллированной воде. Раствор центрифугируют или фильтруют для удаления нерастворимой части и к нему вновь прибавляют сернокислый аммоний до появления первой стойкой мути. Вторая кристаллизация наступает через 10 мин. после доведения насыщения раствора белка сернокислым аммонием до указанной концентрации. Третья перекристаллизация проводится так же, как и вторая.

Методы определения активности глюкозооксидазы

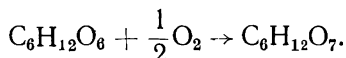
Все методы определения активности глюкозооксидазы основаны либо на манометрическом определении количества кислорода, потребленного для окисления глюкозы при определенных условиях, либо на определении продуктов реакции — перекиси водорода и глюконовой кислоты. Последняя образуется из первичного продукта реакции δ -лактона глюконовой кислоты (спонтанно):





Определение активности глюкозооксидазы по потреблению кислорода манометрическим методом впервые было предложено Кейлин и Хартри [20]. Активность фермента они выражали величиной Q_{O_2} — количеством кислорода, потребленного за 1 час на 1 мг вещества, то есть величиной, принятой для выражения активности дыхательных ферментов.

Поскольку препараты глюкозооксидазы часто содержат каталазу, расщепляющую перекись водорода, многие авторы при манометрическом методе определения активности глюкозооксидазы прибавляют в инкубационную смесь избыток каталазы [23 и др.]. В присутствии каталазы перекись водорода расщепляется. $2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{катализа} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ и суммарная реакция окисления глюкозы выглядит так:



Таким образом, в присутствии избытка каталазы определяется потребление только половины кислорода, ушедшего на окисление глюкозы, а другая половина его опять освобождается при расщеплении перекиси водорода каталазой.

В этом случае, чтобы вычислить потребление кислорода, необходимо полученную манометрическим определением величину умножить на два.

Различные авторы варьируют и другие условия определения активности глюкозооксидазы: температуру (15—35° С), атмосферу (воздух — кислород), применяемый буфер (фосфатный — ацетатный). Однако в настоящее время большинство исследователей определя-

ет активность глюкозооксидазы при 30° С на ацетатном буфере в атмосфере воздуха. При определении активности в атмосфере воздуха величина Q_{O_2} ниже, чем при определении активности в атмосфере 100% кислорода, в 2,6—2,8 раза [23].

Как уже отмечалось, некоторые исследователи предпочитают определять активность глюкозооксидазы по продуктам реакции: прямому — перекиси водорода и по глюконовой кислоте [34, 42]. При определении активности по количеству образовавшейся перекиси водорода легко произвести расчеты и узнать количество потребленного кислорода. Если реакция протекает в отсутствии каталазы, то при окислении 1 *моль* глюкозы потребляется 1 *моль* кислорода и образуется 1 *моль* перекиси водорода. 1 *моль* O_2 равен 32 г, а 1 *моль* H_2O_2 — 34 г. Соответственно 1 *ммоль* O_2 — 32 мг, а 1 *ммоль* H_2O_2 — 34 мг. 1 *ммоль* O_2 при температуре 0° С и давлении 760 мм ртутного столба занимает объем 22 400 *мкл* (или *мм*³). При температуре 20° С и том же давлении 1 *ммоль* занимает объем $\frac{22\,400}{0,932}$ *мм*³ = 24 034 *мм*³, а при температуре 30° С — $\frac{22\,400}{0,904}$ *мм*³ = 24 800 *мм*³. Если во время инкубации образовалось *a* мг перекиси водорода, то 34 мг H_2O_2 соответствуют потреблению 32 мг O_2 , или $\frac{22\,400}{0,932} = 24034$ *мм*³, в таком случае *a* мг H_2O_2 соответствует *x* *мм*³ O_2 .

$$\text{Отсюда } x = \frac{a \times 24\,034}{34}, \text{ т. е. } a \times 707 \text{ мм}^3.$$

Зная длительность инкубации и количество фермента в инкубационной смеси, можно высчитать количество кислорода, потребляемого за 1 час на 1 мг вещества (или белка), т. е. Q_{O_2} .

Определение активности глюкозооксидазы по количеству образовавшейся перекиси водорода (см. стр. 68) так же, как и определение активности манометрическим методом, можно производить как в атмосфере кислорода, так и в атмосфере воздуха. При определении активности в атмосфере кислорода необходимо дозировать количество кислорода, которым насыщается инкубационная смесь.

Вторым методом определения активности глюкозооксидазы по образованию продуктов реакции является титрометрический метод. Определяется количество глюконовой кислоты, образовавшейся во время инкубации. Однако и тут нет единой прописи. Так, Андеркофлер [42] рекомендует определение активности производить при температуре 35°C в атмосфере кислорода. В качестве буфера рекомендуется раствор из 2,84 мл (3г) ледяной уксусной кислоты и 2,92 г NaCl в 900 мл дистиллированной воды, доведенной до pH 5,1 прибавлением NaOH и затем до объема 1000 мл. На этом буферном растворе готовится 3%-ный раствор глюкозы. 25 мл приготовленного раствора помещают в пробирку (25 × 30 мм), подогревают на водяной бане до 35°C , пипеткой добавляют 1 мл активного раствора фермента, содержащего около 15 единиц глюкозооксидазы. Слепой опыт готовится таким же образом, за исключением того, что раствор фермента кипятят перед прибавлением. Для предотвращения вспенивания к каждой пробирке добавляют по три капли насыщенного раствора октаденола в спирте. Пробирки аэрируют при помощи стеклянных распылителей (Корнинг № 39 533С) в течение 15 мин. со скоростью $700\text{ см}^3/\text{мин}$ по счетчику (это очень важная деталь). Затем содержимое каждой пробирки количественно переносят в колбу Эрленмеера емкостью 150 мл с 10 мл 0,1N NaOH; после этого содержимое колбы титруют 0,05N HCl (по фенолфталеину).

Активность фермента Андеркофлер выражает числом единиц в 1 г глюкозооксидазы по следующей формуле:

$$\frac{\text{мл HCl в слепом опыте} - \text{мл HCl в пробах} \times 3 \times 1000}{\text{мг фермента в 1 мл испытуемого образца}}$$

Однако для определения количества единиц глюкозооксидазы в грамме препарата, кроме результатов титрования, необходимо вывести «произвольный» коэффициент (в приведенной формуле он равен 3), «превращающий разность результатов титрования в манометрические единицы глюкозооксидазы. Это наклон прямой линии, полученной нанесением на оси координат манометрических единиц глюкозооксидазы по отноше-

нию к прямой, выражающей разность результатов титрования, полученных при испытании тех же самых образцов препарата» [42].

Таким образом, этот метод не является таким уж простым, так как требует экспериментального выведения коэффициента для каждого образца препарата с определением манометрических единиц.

Покровская, Новикова и Финогенова [34], используя принцип других авторов, в том числе и Андеркофлера, предложили свою модификацию определения активности глюкозооксидазы. Согласно их прописи, инкубация проводится в колбах емкостью 250 мл, содержащих по 25 мл субстрата (3% раствора глюкозы на 0,006 M фосфатном буфере pH 5,6) и 5 мл раствора фермента в атмосфере воздуха при 26—27° С в течение 30 мин. Аэрация осуществляется встряхиванием на качалках со скоростью 250 качаний в 1 мин. Затем колбы кипятятся ровно три минуты. Контролями служат такие же смеси, которые кипятят три минуты тотчас после прибавления раствора фермента. Для каждого определения необходимы две параллельные пробы (и опыта, и контроля). Образовавшуюся глюконовую кислоту оттитровывают 0,1 N NaOH. За единицу активности авторы принимают образование в этих условиях инкубации 0,1 ммоль глюконовой кислоты и считают, что число миллилитров 0,1 N щелочи, которые пошли на титрование реакционной смеси (за вычетом контроля), соответствует числу единиц ферментативной активности в 5 мл исследованного раствора. Перевода своих единиц в манометрические авторы не дают.

Данная модификация хотя и упрощает метод, предложенный Андеркофлером, делает метод менее точным (не учитывает перевода полученных результатов в манометрические единицы), а результаты — трудно сравнимыми с принятыми единицами. Одним из недостатков этой модификации является прекращение реакции трехминутным кипячением (особенно контроля). Время, необходимое для доведения жидкости в колбе до кипения, варьируют. Оно зависит от интенсивности нагрева, толщины стекла колбы и др. Следовательно, какой-то отрезок времени инкубационная смесь подогревается до 20—35° С и в это время интенсивно протекает глюкозооксидазная реакция. Такое подогревание отра-

зится на опытных пробах меньше, чем на контрольных, так как в опытных пробах оно совпадает с 31—33 минутами инкубации, когда реакция замедляется. В контрольных пробах подогревание совпадает с первыми минутами реакции (тотчас после прибавления фермента) и может значительно исказить результаты.

Также следует отметить, что не во всех случаях весь δ -лактон глюконовой кислоты успевает полностью превратиться в глюконовую кислоту. Поэтому отрицательной стороной метода определения глюкозооксидазной активности по образованию количества глюконовой кислоты следует считать то, что он не всегда дает точное представление о количестве окислившейся глюкозы и не всегда может дать представление о количестве потребленного кислорода, так как в зависимости от содержания в препаратах каталазы «кислородсвязывающая» активность препаратов будет разной. Ввиду этого нам кажется, что определение активности по количеству глюконовой кислоты можно производить либо в препаратах, не содержащих каталазы, либо в присутствии избытка этого фермента.

Значительные расхождения существуют в определении единицы глюкозооксидазной активности у разных авторов. Так, в справочнике фирмы «Сигма» [43] указывается, что одна единица глюкозооксидазы окисляет 1 $\mu\text{моль}$ глюкозы до глюконовой кислоты за 1 мин. при pH 5,1 и 35° C, что эквивалентно потреблению кислорода 22,4 $\mu\text{мл/мин}$, но нет указаний на то, относятся ли эти величины к определению в атмосфере кислорода или воздуха. Однако результаты проверки одного из образцов глюкозооксидазы этой фирмы у нас в лаборатории дают основание предположить, что предусматривается определение в атмосфере кислорода.

Согласно манометрическому определению активности глюкозооксидазы, предложенному Скоттом, как указывает Андеркофлер [42], единица активности глюкозооксидазы определяется как количество фермента, которое вызывает потребление 10 мм^3 кислорода в минуту в аппарате Варбурга при 30° C в присутствии избытка кислорода в реакционной смеси, содержащей 3,3% моногидрата глюкозы и фосфатный буфер с величиной pH 5,9. Кусан [23] выражает активность очищенных и кристаллических препаратов глюкозооксидазы

количеством мм^3 кислорода, потребленного на единицу оптической плотности при $280 \text{ м}\mu$ за 1 мин. Из этой величины легко рассчитать величину Q_{O_2} (за 60 мин.). Наконец, за единицу Соретта принимают поглощение 10 мм^3 кислорода в среде, содержащей избыток каталазы.

Таким образом, если выразить активность одного образца препарата глюкозооксидазы различными единицами, можно прийти к выводу о неудовлетворительном положении в этом вопросе и о необходимости установления единой единицы измерения. Также необходимо при пересчете молярных единиц в объемные (мм^3) учитывать температуру опытов, а не принимать объем $1 \text{ мкмоль } O_2$ равным $22,4 \text{ мм}^3$ при всякой температуре.

Отсутствие стандартного способа для установления соотношения между скоростью реакции и единицей активности фермента и существование различных, часто несопоставимых единиц для одного и того же фермента (например, глюкозооксидазы), привело к необходимости создания международной Комиссии по ферментам. Комиссия установила такое определение единицы, которое применимо ко всем ферментам, выражает их активность в абсолютных величинах и позволяет сопоставлять активности различных ферментов. Комиссия рекомендовала такое определение единицы: «За единицу (E) любого фермента принимается то количество его, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата в минуту при заданных условиях» [44]. Необходимо указывать температуру, при которой определяется активность, и по возможности придерживаться температуры 25°C . Также рекомендуется, чтобы определение активности ферментов основывалось по возможности на начальной скорости реакции, а не на количестве субстрата, превращенного к концу определенного периода времени, если нет уверенности в том, что скорость реакции на протяжении этого периода остается постоянной. Для облегчения измерения начальной скорости желательно, чтобы исходная концентрация субстрата была достаточной для насыщения фермента с тем, чтобы в стандартном тесте кинетика реакции приближалась к кинетике нулевого порядка.

Учитывая рекомендации Комиссии и свойства глю-

козооксидазы, мы считаем, что активность глюкозооксидазы целесообразно выражать величиной Q_{O_2} — количеством $мм^3$ кислорода, потребленных за один час на 1 мг белка¹ в атмосфере кислорода при 30° С на ацетатном буфере рН 5,8, содержащем 3% глюкозы, — в условиях, оптимальных для проявления активности. Активность следует вычислять по потреблению кислорода в первые 10 мин. инкубации. При наличии в препаратах глюкозооксидазы каталазы определение активности целесообразно производить в присутствии избытка каталазы. Необходимым условием являются также стандартные условия аэрации — 80—90 качаний в минуту. При определении активности по образованию перекиси водорода в атмосфере воздуха необходимо колбы закрывать ватными пробками и соблюдать ту же частоту качаний и при пересчетах учитывать поправку на температуру, насыщение кислородом среды, а также соотношение между активностью при этом насыщении кислородом и в атмосфере 100% кислорода.

Исходя из того, что культуральная жидкость *P. vitale* (микроцид) и очищенные препараты глюкозооксидазы обладают высокой антибиотической активностью по отношению к широкому кругу микроорганизмов, наряду с определением ферментативной активности проводилось определение и антибактериальной активности.

Антибактериальная активность определялась методом серийных разведений на 1%-ном глюкозном бульоне по отношению к *Staph. aureus* 209 при содержании в 1 мл бульона 100 000 микробных тел тест-культуры. Результаты учитывались после 24-часовой инкубации проб в термостате при 37° С.

СВОЙСТВА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ ИЗ *PENICILLIUM VITALE*

Свойства глюкозооксидазы в культуральной жидкости (микроцида)

При изучении различных свойств глюкозооксидазы всегда учитывалась ферментативная активность ее препаратов.

Активность глюкозооксидазы мы определяли маноме-

¹ Содержание белка в препаратах определяют по поглощению света при 280 *мμ*.

трически по методу Кейлин и Хартри [20] с некоторыми изменениями. Для определения ферментативной активности нативных препаратов микроцида использовался аппарат Варбурга. Опытная смесь содержала в главном пространстве 0,2 мл микроцида, 1,8 мл 0,1 М ацетатного или фосфатного буфера рН 5,8; в боковом от-

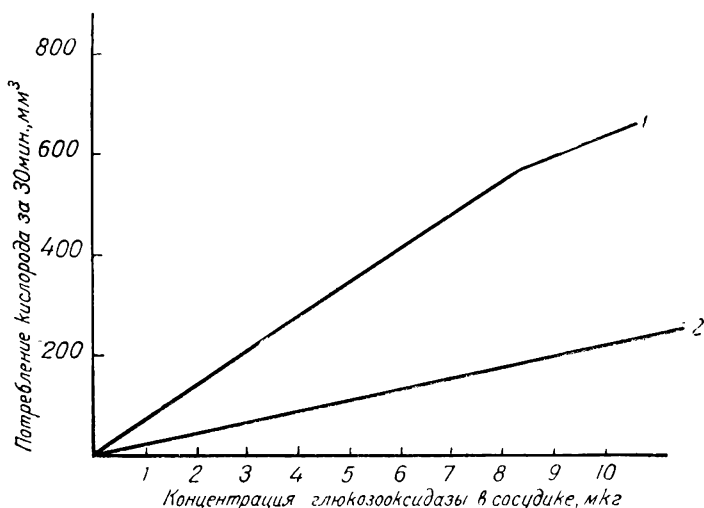


Рис. 13. Отношение между концентрацией фермента его активностью:

1 — в атмосфере кислорода, 2 — в атмосфере воздуха.

ростке — 0,2 мл 15%-ной глюкозы; в центральной чашечке — 0,2 мл 10%-ного NaOH или дистиллированной воды. Для определения активности очищенных и кристаллических препаратов реакционная смесь содержала в главном пространстве 0,2 мл раствора фермента (2—5 мкг), 1,8 мл 0,1 М ацетатного буфера рН 5,8 (в некоторых опытах применялся фосфатный буфер); в боковом отростке — 0,2 мл 15%-ной глюкозы; в центральной чашечке — 0,2 мл H_2O или буфера. Активность глюкозооксидазы определялась в большинстве случаев в атмосфере кислорода, в некоторых опытах — в атмосфере воздуха при 30° С. Как можно видеть из рис. 13, в наших условиях определения потребление кислорода при количестве фермента в сосудах колеблется в пределах 8 мкг пропорционально концентрации

фермента (как в атмосфере кислорода, так и в атмосфере воздуха).

Концентрацию белка в очищенных и кристаллических препаратах определяли по величине абсорбции при 280 $m\mu$. Как показали наши предварительные исследования, величина E при 280 $m\mu$ (определение на СФ-4 в односантиметровых кюветах) строго соответствует содержанию ферментного белка (величина оптической плотности при 280 $m\mu$, равная 1, соответствует содержанию в 1 $мл$ раствора 1 $мг$ глюкозооксидазы), что соответствует данным Кусаи [23].

Чистоту ферментных препаратов (кристаллических и некоторых очищенных) мы выражаем, согласно Кусаи [23], отношением концентрации белка к флавину, равному отношению величины абсорбции при 280 $m\mu$ к абсорбции при 460 $m\mu$, и загрязнение цветными примесями — отношением величины абсорбции при 380 к 460 $m\mu$.

Активность препаратов выражали величиной Q_{O_2} — количество $мм^3$ потребленного кислорода на 1 $мг$ белка за 60 мин. (высчитывали из величины потребления кислорода в первые 10 мин. инкубации).

Исходя из того, что наши препараты глюкозооксидазы не содержали каталазы, мы определяли активность фермента также по количеству образовавшейся перекиси водорода. В этих случаях инкубационная смесь помещалась в колбочки емкостью 50 $мл$ и содержала 4,5 $мл$ 0,1 M буфера (ацетатного или фосфатного), 0,5 $мл$ 15%-ной глюкозы и 0,5 $мл$ ферментного раствора (очищенного или нативного). В большинстве опытов инкубация проводилась при комнатной температуре 10—30 мин. при встряхивании (шуттель-аппарат) в атмосфере воздуха. Через 30 мин. инкубации из каждой колбочки отбирали по 2 $мл$ смеси и к ним прибавляли 1 $мл$ 20%-ной (5 N) H_2SO_4 , по 5 $мл$ 1%-ного KJ и одну каплю 1%-ного молибденовокислого аммония. Через 3 мин. свободный йод, выделившийся за счет KJ , оттитровывали 0,02 N гипосульфитом. 1 $мг$ 0,02 N гипосульфита эквивалентен 0,34 $мг$ перекиси водорода.

Учитывая, что при 20° C 1 $ммоль$ газа равен 24 034 $мм^3$, а 1 $ммоль$ $H_2O_2 = 34 \cdot мг$ H_2O_2 соответствует потреблению 1 $ммоль$, или 32 $мг$ $O_2 = 24\,034 \cdot мм^3$, можно рассчитать количество потребленного кислорода

в мм^3 по количеству образовавшейся H_2O_2 по формуле

$$x = \frac{a \cdot 24\,034}{34}$$

где a — количество мг H_2O_2 , образовавшейся в пробе; 24 034 — $\text{мм}^3\text{O}_2$, соответствующие 1 ммоль O_2 и 1 ммоль H_2O_2 ; 34 мг H_2O_2 в 1 ммоль H_2O_2 .

δ -лактон глюконовой кислоты определяли по методу Кори и Липмана [45].

Как уже отмечалось, нативный жидкий микроцид широко вошел в медицинскую практику для наружного применения [35, 36]. В связи с этим вопрос производства микроцида с более высокой активностью или изыскание путей повышения его активности является практически очень важным.

Современная ферментология изобилует фактами, показывающими, что некоторые ионы металлов оказывают большое влияние на ферментативные системы. Так, Бернгау [46] указывает на активирующее действие солей марганца (MnSO_4) на процесс образования глюконовой кислоты мицелием *Aspergillus niger* Покровская, Новикова и Финогенова [34] наблюдали повышение глюкозооксидазной активности культуральной жидкости ряда штаммов плесневых грибов при выращивании их на среде с мелом.

Основываясь на предварительных опытах, полученных в нашей лаборатории, Диденко [47, 49] провела исследования, имевшие целью выяснить влияние различных катионов, анионов и др. веществ на активность нативного микроцида (культуральной жидкости *P. vitale*).

Ферментативную активность микроцида она определяла по потреблению кислорода в аппарате Варбурга. Опыты проводились на 0,1М фосфатном буфере при рН 6 и на глюкозном бульоне. О глюкозооксидазной активности микроцида Диденко судила по количеству потребленного кислорода и по количеству перекиси водорода, образовавшейся в инкубационной смеси. Проведенные ею исследования показали следующее (табл. 15) ионы Ca^{++} , Mn^{++} , NH_4^+ (в концентрации 0,01—0,02М) в значительной степени (в несколько раз) активируют процесс окисления глюкозы, катализируемый микроцидом (глюкозооксидазой) в культуральной жидкости как по потреблению O_2 , так и по образованию H_2O_2 . Не-

сколько меньший активирующий эффект оказывают ионы Cl^- . Ионы Mg^{++} , Ba^{++} , K^+ , Co^{++} , Cd^{++} , как и ионы SO_4^{--} , CH_3COO^- , не влияют на скорость глюкозооксидазной реакции.

Активирующее влияние на глюкозооксидазную активность микроцида оказывают также анионы щавелевой и лимонной кислот, а также некоторые аминокислоты—аланин, гликокол, аспарагиновая кислота (рис. 14).

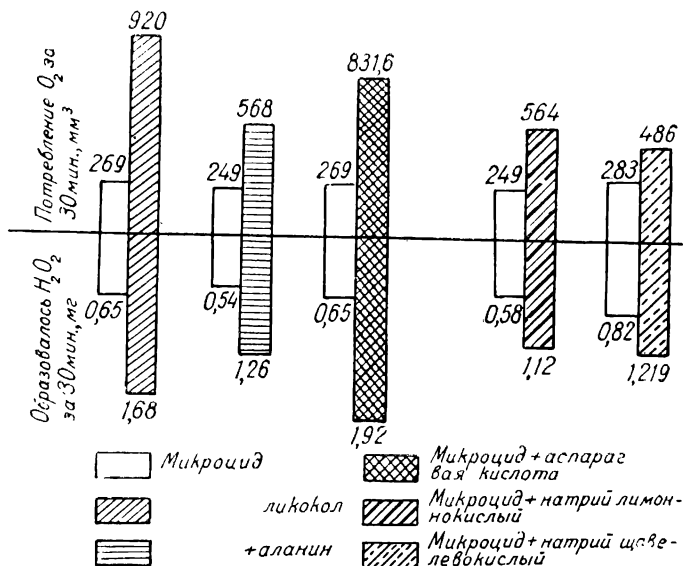


Рис. 14. Влияние некоторых аминокислот и лимонной и щавелевой кислот на ферментативную активность микроцида.

Увеличение ферментативной (глюкозооксидазной) активности микроцида ионами Ca^{++} , Mn^{++} наблюдается также при постановке опытов на глюкозном мясептонном бульоне при pH 6,5, однако величина этой активации ниже, чем при постановке опытов на фосфатном буфере. Сама же ферментативная активность на глюкозном бульоне выше, чем на фосфатном буфере [47].

Исходя из имеющихся литературных данных о том, что механизм антибактериального действия антибиотиков глюкозооксидазной природы основывается на действии на микроорганизмы перекиси водорода, образу-

**Влияние некоторых катионов и анионов на ферментативную
активность микроцида***

Дата опыта	Контроль		Опыт		
	Потреблено O ₂ за 30 мин. на 0,2 мл микроцида, мм ³	Обра- зова- лось H ₂ O ₂ , мг	Молярная кон- центрация прибав- ленных солей	Потреблено O ₂ за 30 мин. на 0,2 мл микроцида, мм ³	Обра- зова- лось H ₂ O ₂ , мг
24.IV 1951	87,52	0,1775	0,02 CaCl ₂	369,4	0,9196
»	87,52	0,1775	0,01 MnCl ₂	328,4	0,8482
8.VI 1951	47,0	0,1421	0,04 MnCl ₂	128,3	0,374
»	47,0	0,1421	0,09 MnCl ₂	337,5	1,099
1.II 1952	337,7	0,7704	0,01 NH ₄ Cl	614,6	1,3314
11.II 1952	337,7	0,7704	0,1 CH ₃ COONH ₄	637,8	1,4361

* Приведено по одному характерному опыту из каждой серии.

Таблица 16

**Влияние различных концентраций CaCl₂ и MnCl₂ на ферментативную
и бактериостатическую активность микроцида**

Дата опыта	Добавлены соли	Потреблено O ₂ на 0,2 мл микроцида, мм ³	Образовалось H ₂ O ₂ , мг	Бактериоста- тическая активность (титр)
4.V 1951	Контроль	53,1	0,110	1:100000
	0,01M MnCl ₂	479,2	0,5612	1:100000
	0,02M CaCl ₂	698,4	0,904	1:1000
1.VI 1951	Контроль	72,8	0,2057	1:100000
	0,01M MnCl ₂	207,7	0,7854	1:10000
	0,02M CaCl ₂	340,0	0,9064	1:1000
28.VI 1952	Контроль	344,8	0,9279	
	0,001M CaCl ₂	342,1	0,9169	
26.IV 1952	Контроль	346,8	1,2267	
	0,001M CaCl ₂	377,9	1,2566	
16.VII 1952	Контроль			1:100000
	0,0008M CaCl ₂			1:80000000
	0,0008M MnCl ₂			1:40000000
4.VII 1952	Контроль			1:10000
	0,0008M CaCl ₂			1:400000
	0,0008M MnCl ₂			1:100000

ющей во время окисления глюкозы [9, 17, 48], можно было предполагать, что в присутствии концентраций солей CaCl_2 и MnCl_2 , повышающих ферментативную активность микроцида (и повышающих количество образующейся перекиси водорода), будет наблюдаться и повышение его антибиотической активности.

Антибиотическую активность микроцида Диденко определяла методом биологической титрации [49], выдерживая его с определенным количеством CaCl_2 или MnCl_2 полтора-два часа перед титрацией. Параллельно были проведены опыты, целью которых было выяснить влияние определенных концентраций CaCl_2 на ферментативную активность микроцида при условии добавления в инкубационную смесь раствора солей непосредственно перед самым началом опыта и предварительной инкубации солей с микроцидом (полтора-два часа) до добавления глюкозы. Эти опыты показали, что предварительная инкубация микроцида с CaCl_2 не меняет его активирующего действия на фермент.

Что же касается влияния концентраций CaCl_2 и MnCl_2 , повышающих ферментативную активность микроцида, на его антибиотическую активность, то Диденко [49] установила следующее (табл. 16): концентрации CaCl_2 (0,02M) и MnCl_2 (0,005—0,02M и больше), которые значительно (в 2—4 и больше раз) повышают ферментативную активность нативного жидкого микроцида, вызывая увеличенное потребление кислорода и образование перекиси водорода, не повышают, а часто даже в значительной степени снижают антибактериальную активность микроцида. Активирующее действие на бактериостатическую активность микроцида оказывали значительно меньшие концентрации этих солей: 0,0008M, которая не повышает ферментативную активность.

В связи с этим было высказано предположение, что низкие (0,0008M) концентрации CaCl_2 и MnCl_2 оказывают непосредственное влияние на фермент. К такому предположению привели следующие данные: при добавлении указанных концентраций солей в первую пробирку ряда непосредственно перед титрацией их активирующее влияние значительно меньше, чем в тех случаях, когда раствор соли предварительно выдерживался с микроцидом полтора-два часа. Активирующее

влияние указанных концентраций CaCl_2 и MnCl_2 сохраняется при предварительном выдерживании микроцида с солями вплоть до семи суток.

Подтверждением факта активации глюкозооксидазы различными катионами и анионами могут служить также следующие данные. Изучая влияние очищенных

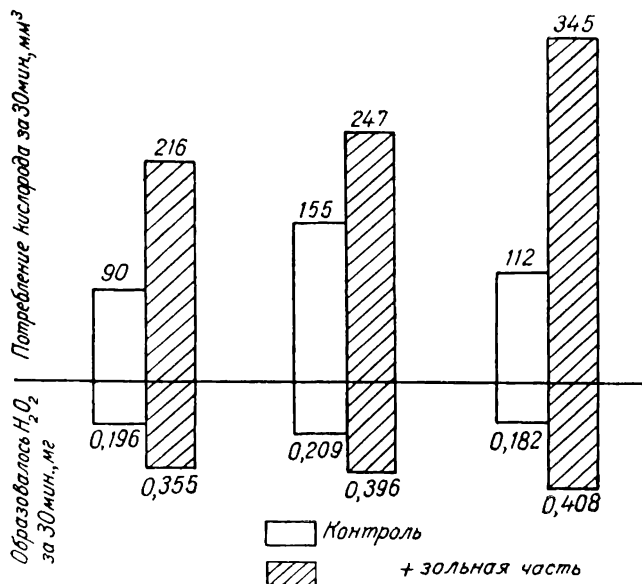


Рис. 15. Влияние зольной части печеночных гомогенатов на активность очищенных препаратов глюкозооксидазы.

препаратов микроцида (глюкозооксидазы) на обмен веществ в животном организме, мы столкнулись с явлением значительного повышения активности глюкозооксидазы прокипяченными фильтратами печеночной ткани. Дальнейшие исследования показали, что ответственной за активацию является зольная, т. е. минеральная часть печеночной ткани (рис. 15)

Таким образом, данные, полученные Диденко, давали основание предположить, что активирующее влияние на микроцид указанных солей обусловлено действием их на фермент глюкозооксидазу.

Проверка влияния указанных солей на очищенные препараты глюкозооксидазы показала, что определенные концентрации хлористого кальция и хлористого

марганца, активируя фермент, способствуют повышению потребления кислорода и повышению образования продуктов реакции — перекиси водорода и δ -лактона глюконовой кислоты (рис. 16), однако степень его активации меньшая, чем нативного микроцида.

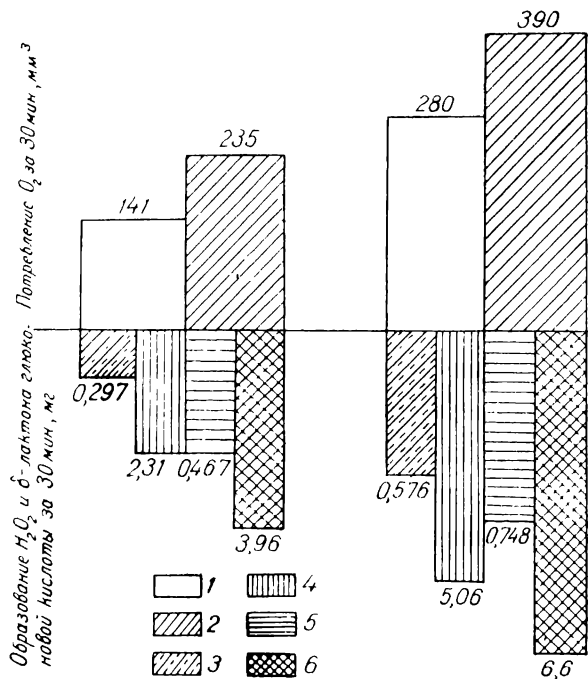
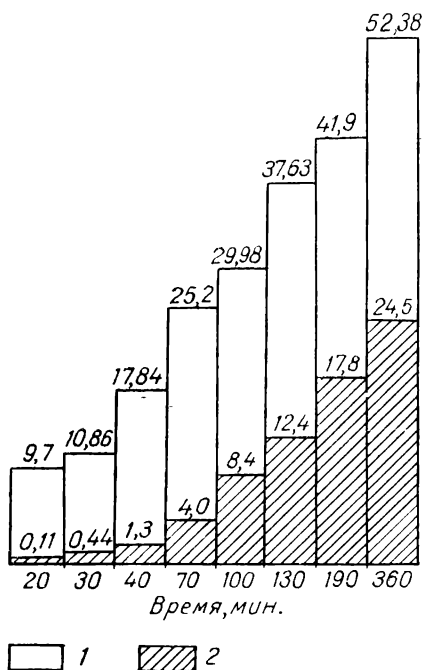


Рис. 16. Влияние CaCl_2 (0,0064—0,0128M) на активность глюкозооксидазы (потребление кислорода и образование H_2O_2 и δ -лактона глюконовой кислоты)

1 — потребление O_2 в контроле; 2 — потребление O_2 в присутствии CaCl_2 ; 3 — H_2O_2 в контроле; 4 — δ -лактон глюконовой кислоты в контроле; 5 — H_2O_2 в присутствии CaCl_2 ; 6 — δ -лактон глюконовой кислоты в присутствии CaCl_2 .

По характеру кривых, полученных при определении потребления кислорода в системе без хлористого кальция и с ним, можно судить о том, что в присутствии указанных количеств этих солей имеет место активирующее, а не стабилизирующее их действие. Поэтому возник вопрос о механизме активирующего действия указанных веществ в отношении глюкозооксидазы.

Как уже отмечалось ранее, Бентлей и Нейбергером [21] было показано, что первым продуктом окисления глюкозы препаратами глюкозооксидазы (нотатина) является δ -лактон глюконовой кислоты. Диденко [50] повторила опыты Бентлей и Нейбергера с препаратами



очищенной глюкозооксидазы (микроцида). Она показала, что при инкубации раствора очищенной глюкозооксидазы на фосфатном буфере с глюкозой в начале опыта образуется незначительное количество свободной глюконовой кислоты по сравнению с общей глюконовой

Рис. 17 Скорость образования свободной и общей глюконовой кислоты в процессе окисления глюкозы глюкозооксидазой:

1 — процент первоначально присутствующей глюкозы, превращенной в общую глюконовую кислоту; 2 — процент первоначально присутствующей глюкозы, превращенной в свободную глюконовую кислоту.

кислотой. При этом скорость образования общей глюконовой кислоты зависит от скорости образования свободной глюконовой кислоты, что говорит в пользу того, что первым продуктом окисления глюкозы является нейтральное вещество — лактон (рис. 17). Прибавление к инкубационной смеси δ -лактона глюконовой кислоты тормозило реакцию — уменьшалось потребление кислорода.

В пользу того, что первым продуктом окисления глюкозы, катализируемого очищенными препаратами глюкозооксидазы из *P. vitale*, является δ -лактон глюконовой кислоты, свидетельствуют наши опыты, в которых

мы непосредственно определяли δ -лактон глюконовой кислоты по методу Кори и Липмана [46], основанному на способности δ -лактона образовывать с гидроксил-амином гидроксамовую кислоту. По мере окисления глюкозы мы наблюдали наряду с потреблением кислорода образование δ -лактона глюконовой кислоты. При повышении потребления кислорода, вызванном прибавлением хлористого кальция, наблюдается усиленное образование δ -лактона глюконовой кислоты (рис. 16).

Еще одним доказательством того, что δ -лактон является первым продуктом окисления глюкозы, катализируемого глюкозооксидазой, служит резкое торможение реакции окисления глюкозы при добавлении δ -лактона в первые минуты. Затем, по мере превращения δ -лактона в глюконовую кислоту, торможение реакции уменьшается (рис. 18). Согласно данным Избела, фосфатный буфер способствует раскрытию лактонного кольца [51].

Если инкубационная смесь помимо лактона глюконовой кислоты содержит определенное количество CaCl_2 , прибавление δ -лактона глюконовой кислоты приводит также к резкому падению потребления кислорода в первые 10 минут, однако и при дальнейшей инкубации не наблюдается повышения потребления кислорода, т. е. нет уменьшения торможения реакции, а наоборот, это торможение увеличивается, усугубляется (рис. 18). Характер кривых, отображающих ход ферментативной реакции и влияния на нее CaCl_2 и δ -лактона глюконовой кислоты, свидетельствует, как нам представляется, о стабилизации лактона глюконовой кислоты указанными концентрациями хлористого кальция.

С этой точки зрения является возможным объяснить факт активации определенными молярными концентрациями CaCl_2 бактериостатической активности микроцида, обнаруженный Диденко. Как показала Диденко [50] и Гулый, Шур-Шультц и Дегтярь [52], δ -лактон глюконовой кислоты, уменьшая ферментативную активность глюкозооксидазы, одновременно значительно увеличивает ее бактериостатическую активность (табл. 17). Следовательно, увеличение бактериостатической активности глюкозооксидазы (и нативного микроцида) в присутствии определенных количеств CaCl_2 можно объяснить тем, что эти количества активатора стабили-

Влияние CaCl_2 и δ -лактона глюконовой кислоты на бактериостатическую активность
нативного микроцида и очищенной глюкозооксидазы
(приводится по одному характерному опыту из каждой серии)

Препарат	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Титр
	Разведение										
	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	1:200000	1:400000	1:800000	1:1,6 млн.	1:3,2 млн.	
Нативный мик- роцид	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1:400000
Нативный мик- роцид + CaCl ₂ 0,0064 M	0,055	0,0055	0,0034	0,0018	0,0009	0,0005	0,00017	—	—	—	1:1,6 млн
Нативный мик- роцид	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1:10000
Нативный мик- роцид + δ-глю- конолактон	0,0066	0,0028	0,0018	0,0014	0,00099	0,00034	Следы	—	—	—	1:400000

Дальнейшие разведения (при исходном разведении 1:1000)

Глюкозооксидаза	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	1:1 млн.	1:10 млн.	1:100 млн.	1:1 млрд.	1:10 млрд.	10 ⁻¹⁰
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1:1 млрд.
Глюкозооксидаза + δ -глюконолактон	0,0106	0,0042	0,0009	0,00011	0,0007	0	0	—	—	—	10 ⁻¹⁰
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1:10 млрд.
Глюкозооксидаза + δ -глюконолактон	0,0093	0,0022	0,0009	0,00067	0,0002	0	0	—	—	—	1:10 млрд.
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1:10 млрд.

* Цифры обозначают номер пробирки.

Обозначения: цифры в таблице — количество H_2O_2 в % прочерк — отсутствие роста микроорганизмов; # — ин-тенсивный рост.

зируют δ -лактон глюконовой кислоты, который в какой-то мере ответственен за бактериостатическую активность глюкозооксидазы. Следует отметить, что имеют-

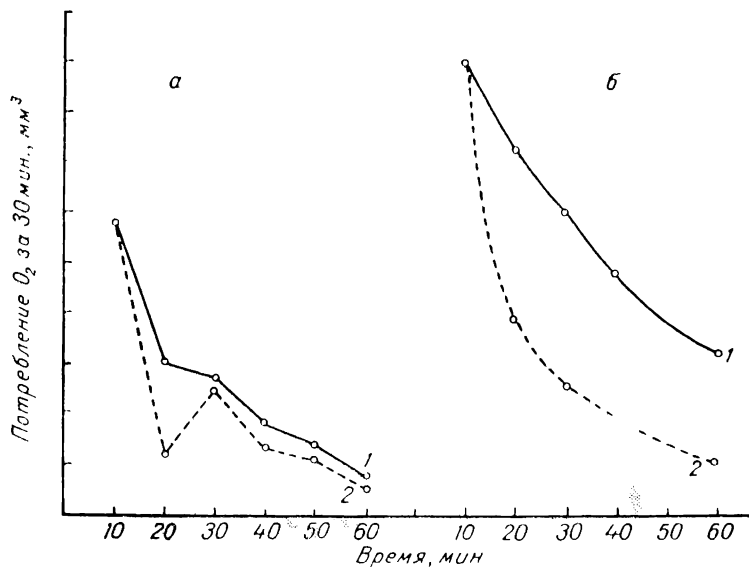


Рис. 18. Влияние δ -лактона глюконовой кислоты на активность глюкозооксидазы без $CaCl_2$ (а) и с $CaCl_2$ (б):

1 — контроль; 2 — δ -лактон.

ся данные Рубина и Джермона [53] о том, что предельные лактоны еще в большей степени, чем непредельные, являются активными антибактериальными веществами.

Свойства кристаллических препаратов глюкозооксидазы

Исследования на ультрацентрифуге¹ трижды перекристаллизованных препаратов глюкозооксидазы показали ее гомогенность (рис. 19). Коэффициент седиментации $S_{20,w}$ равен 7,80 ($7,80 \cdot 10^{-13}$).

Гомогенность кристаллической глюкозооксидазы также показана при электрофорезе на агаровом геле (рис. 20). Электрофорез на геле агара проводился в проточ-

¹ Эти исследования были проведены в лаборатории биохимии ИЭМ (Ленинград) инженером Е. Б. Майзель, за что выражаем ему благодарность.

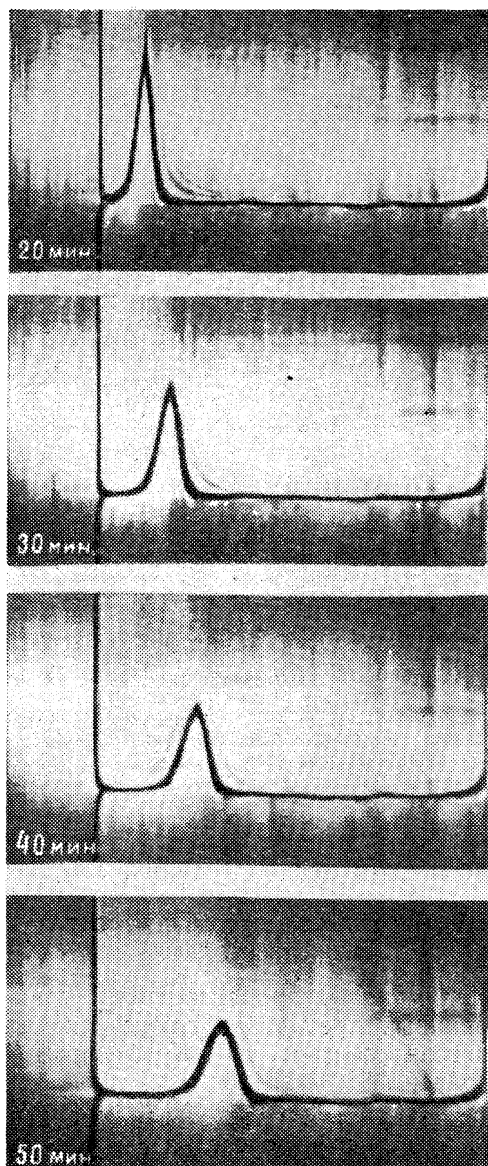


Рис. 19. Диаграмма ультрацентрифугирования кристаллической глюкозооксидазы:

растворитель — 0,1М натрийацетатный буфер; pH 5,6; концентрация белка 0,36%; скорость 50 000 об/мин; интервалы: первый — через 20 мин. после достижения скорости, последующие — через 10 мин.; температура во время опыта — около 20° С.

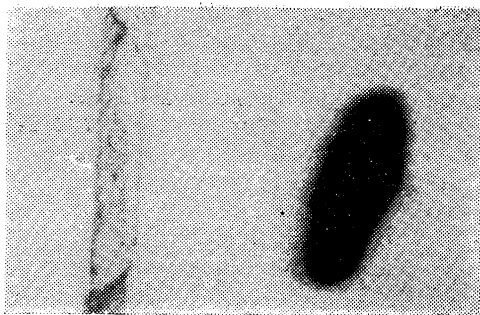


Рис. 20. Электрофореграмма кристаллической глюкозооксидазы на агаровом геле в проточном ацетатном буфере 0,0125M; pH 5,6 при силе тока 25 ма и температуре 5° С. Интервал времени 5 часов.

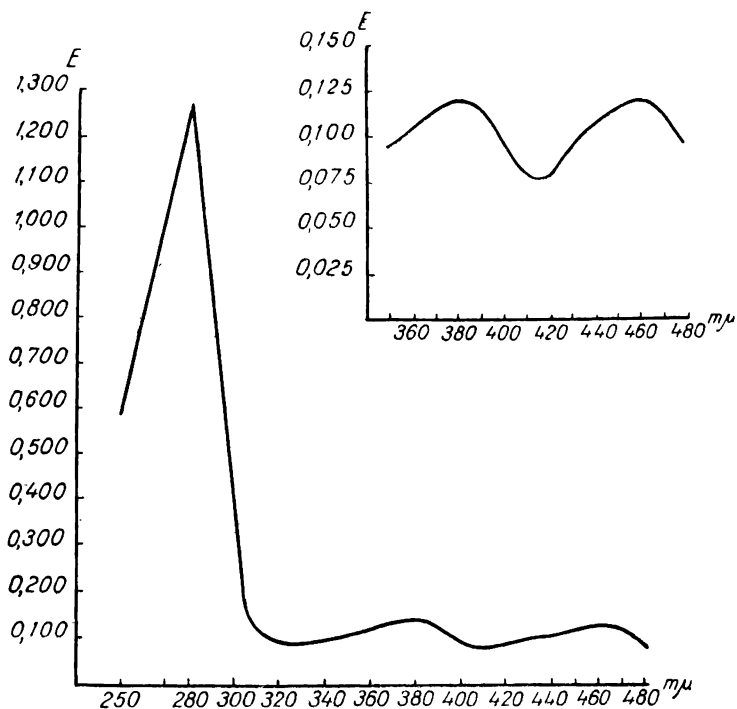


Рис. 21. Спектр абсорбции кристаллической глюкозооксидазы (измерения проводились в спектрофотометре СФ-4).

ном ацетатном буфере 0,0125*M* при рН 5,6, силе тока 25 *ma* и температуре 5° С (5 часов).

Растворы кристаллической глюкозооксидазы, как и препаратов очищенной глюкозооксидазы, дают характерный для этого фермента спектр поглощения с тре-

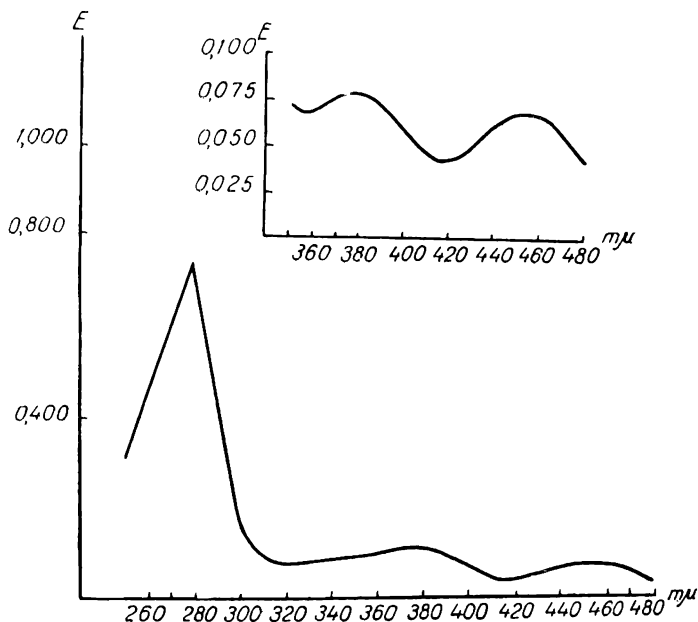


Рис. 22. Спектр абсорбции очищенной глюкозооксидазы (измерения проводились в спектрофотометре СФ-4).

мя максимумами в области 280, 380 и 460 *mμ* (рис. 21, 22). Различия между спектром поглощения кристаллических и очищенных препаратов глюкозооксидазы наблюдаются в отношениях величины абсорбции при длине волны $\frac{380\text{ }m\mu}{460\text{ }m\mu}$. Растворы очищенных препаратов показывают величину *E* при 380 *mμ* большую, чем при 460 *mμ*, что, согласно данным Кусаи [23], свидетельствует о наличии цветных примесей. Величина отношения поглощения света при 380 к 460 *mμ* у кристаллических препаратов глюкозооксидазы равна единице. Эти различия, очевидно, обусловлены загрязнением очищенных препаратов цветными примесями и величина отно-

шения $\frac{E_{380}}{E_{460}}$ у различных очищенных препаратов колеблется, например: № 56 — 1,27, № 57 — 1,28, № 58 — 1,35, № 59 — 1,17. Такое различие может зависеть от некоторых колебаний в количестве расщепившегося на белок и флавиновый компонент фермента в процессе очистки. Отсюда кажется возможным, что и второй белок, обнаруженный Монаховым и Нейфахом в препарате очищенной глюкозооксидазы [54], представляет собой не какой-то инородный белок, а белок глюкозооксидазы, от которого отщепилась флавиновая группа. В пользу этого говорит и тот факт, что из очищенных препаратов глюкозооксидазы, которые, по данным Монахова и Нейфаха, содержат помимо глюкозооксидазы еще один белковый компонент, мы без всякой предварительной обработки (как фильтрация через гель Сефадекс Г-50 и последующее высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) с помощью сернокислого аммония при доведении его насыщения до 52—56% получили глюкозооксидазу в кристаллическом виде, показывающую гомогенность при испытании в ультрацентрифуге.

Данные Монахова и Нейфаха, несомненно, объясняются тем, что они использовали недостаточно очищенные препараты белка, очищенные нашим методом, рекомендованным для производственных целей, не прибегая к дальнейшей его очистке с помощью кристаллизации.

Следует также отметить, что, очевидно, замечание Колхарда, Шорта и др. [10], которые отмечают, что очищенные препараты нотаина отличаются от типичных флавопротеинов тем, что имеют максимум светопоглощения при 380 $m\mu$, а не при 450/460 $m\mu$, является не вполне обоснованным. Увеличенный пик при 380 $m\mu$ является следствием содержания в препаратах цветных загрязнений.

Кристаллические препараты глюкозооксидазы обладают высокой ферментативной активностью — $Q_{O_2} = 186\,400\text{—}200\,000$. Q_{O_2} очищенных препаратов часто оказывается более высоким, чем Q_{O_2} кристаллических препаратов, что, по-видимому, объясняется наличием в сухих очищенных препаратах примесей хлористого аммония, активирующего фермент. Они обладают высокой субстратной специфичностью. При концентрациях

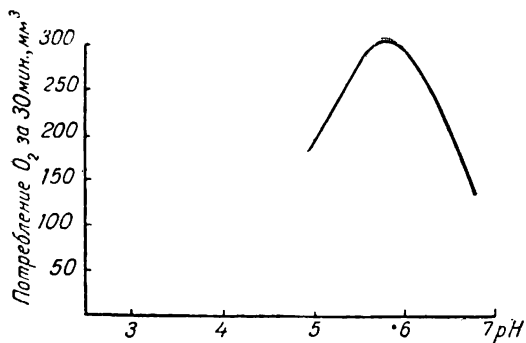


Рис. 23. Оптимум pH кристаллической глюкозооксидазы.

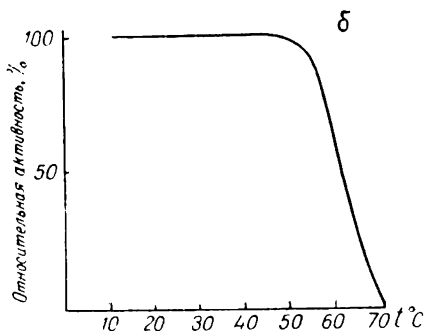
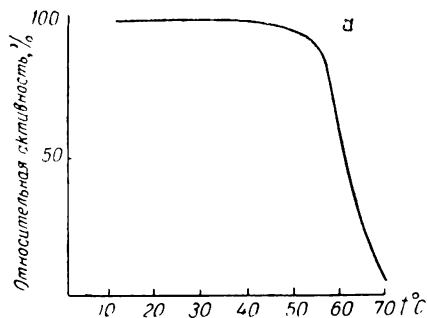


Рис. 24. Стабильность кристаллической глюкозооксидазы при различных pH и температуре (активность определялась манометрическим методом при 30° С в атмосфере кислорода):

а — глюкозооксидаза прогрета 15 мин. при pH 5,6; б — глюкозооксидаза прогрета 15 мин. при pH 4,0.

субстрата 0,125*M* и содержания в пробе 4,0 мкг кристаллической глюкозооксидазы потребление кислорода (мм³ за 30 мин.) при прибавлении глюкозы составляет 250,8 мм³. В присутствии галактозы, фруктозы, лактозы и маннозы потребления кислорода не наблюдается.

О высокой специфичности очищенных препаратов глюкозооксидазы по отношению к глюкозе свидетельствуют данные, приведенные в работе Лукомской и Городецкого [123].

Оптimum pH действия кристаллической глюкозооксидазы, как и очищенной, лежит в области pH 5,8 (рис. 23). (Активность измерялась манометрически при различных pH и температуре 30° С на ацетатном и фосфатном буферах 0,1*M*). Изoeлектрическая точка при определении с помощью ацетатного буферного ряда с подогреванием до 76° С лежит в области pH 4,4.

Исследования стабильности кристаллических препаратов глюкозооксидазы к прогреванию при различных pH и различной температуре установили, что 15-минутное прогревание при 50° С при pH 4,0 не влияет на активность фермента (рис. 24), прогревание при pH 5,6 (без субстрата) и при температуре 50° С почти не снижает активности. Прогревание при 56° С (pH 4 и 5,6) вызывает небольшое падение активности глюкозооксидазы (10—12%). Прогревание при 60° С при указанных pH вызывает падение активности на 33%, дальнейшее повышение температуры вызывает быструю инактивацию фермента.

Очищенные и кристаллические препараты глюкозооксидазы хорошо сохраняют свою стабильность при длительном хранении (более одного года) без потери активности. Глюкозооксидаза устойчива к действию мочевины. Как показали исследования Середы [55], мочевина, находясь в инкубационной смеси, тормозит активность глюкозооксидазы начиная с 1*M* концентрации и выше. В присутствии 2*M* мочевины активность тормозится на 28%. Двухчасовое выдерживание глюкозооксидазы с 1*M* мочевиной не влияет на активность. В нашей лаборатории многими наблюдениями показано, что в результате взаимодействия между высокоочищенными кристаллическими тканевыми ферментами-белками в растворах очень часто заметно изменяется их каталитическая активность [56, 57, 58], что

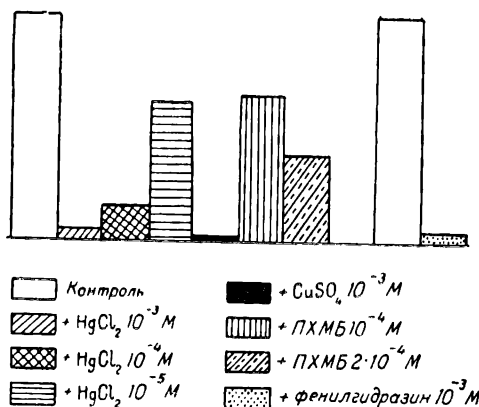


Рис. 25. Влияние сульфгидрильных и карбоновых ядов на активность глюкозооксидазы (%) (активность определялась манометрическим методом при 30°C в атмосфере кислорода).

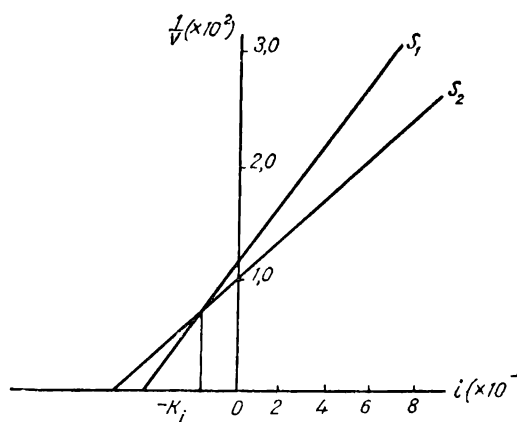


Рис. 26. Характер торможения активности глюкозооксидазы SH-ядами.

Молярная концентрация глюкозы: $S_1 - 0.55 \cdot 10^{-5}$; $S_2 - 1.11 \cdot 10^{-5}$; $i (\times 10^{-4})$ — молярная концентрация SH-яда; v — начальная скорость реакции (мМО_2).

же касается глюкозооксидазы, то одночасовое выдерживание смеси ее с альдолазой и ДГФК (дегидрогеназы α -глицерофосфорной кислоты) при 0—2° С не влияет на ее активность. Продукты неполного гидролиза других белков также не влияют на активность глюкозооксидазы.

На основании полученных данных Середа сделал вывод о том, что глюкозооксидаза в растворе, с одной стороны, находится в состоянии максимальной диссоциации, а с другой,— не образует ассоциатов с тканевыми белками и поэтому не изменяет своей каталитической активности ни под влиянием высокоочищенных белков, ни под влиянием их гидролизатов или мочевины 1M концентрации.

Активность очищенных и кристаллических препаратов глюкозооксидазы из *Penicillium vitale*, как и кристаллических препаратов глюкозооксидазы из *P. atagasakiense*, значительно тормозится сульфгидрильными (такими, как парахлормеркурийбензоат — ПХМБ, HgCl_2 и др.) и карбонильными (такими, как гидроксилламин) ядами (рис. 25). Торможение SH-ядами является конкурентным по отношению к глюкозе (рис. 26).

В работе Кусаи приведен ряд веществ, которые относятся к числу сульфгидрильных ядов и тормозят активность глюкозооксидазы. Однако никаких сведений об обратимости (или необратимости) действия этих веществ нет.

Как уже указывалось, ранее в нашей лаборатории было установлено, что активность нативного микроцида и очищенных препаратов глюкозооксидазы повышается в присутствии ряда катионов и анионов.

В то же время мы наблюдали, что очищенные препараты глюкозооксидазы и кристаллические отдиализованные препараты, полученные по тому же методу [38] из культуральной жидкости нового селекционированного штамма в 1961—1963 гг., обладают очень высокой ферментативной активностью, которая незначительно увеличивается в присутствии указанных анионов и катионов.

В связи со сказанным возник вопрос о механизме действия этих активаторов, и в частности о том, не могут ли они снимать тормозящее действие сульфгидрильных и карбонильных ядов.

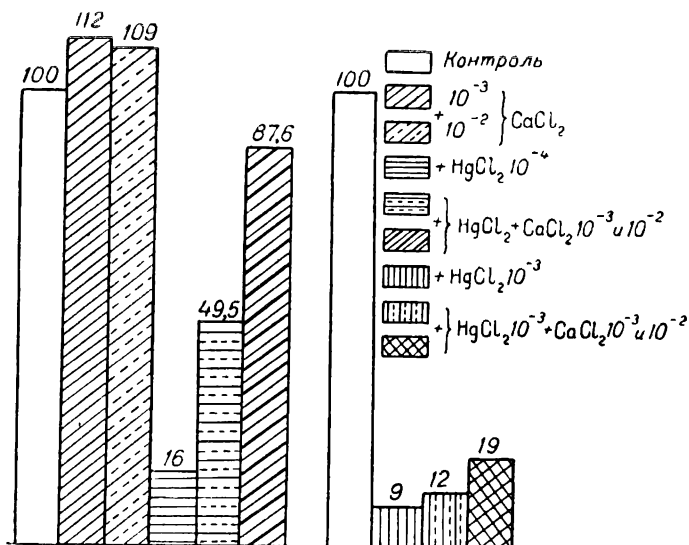


Рис. 27. Влияние различных молярных концентраций HgCl_2 и CaCl_2 на активность глюкозооксидазы (%) (активность определялась манометрическим методом при 30°C в атмосфере кислорода).

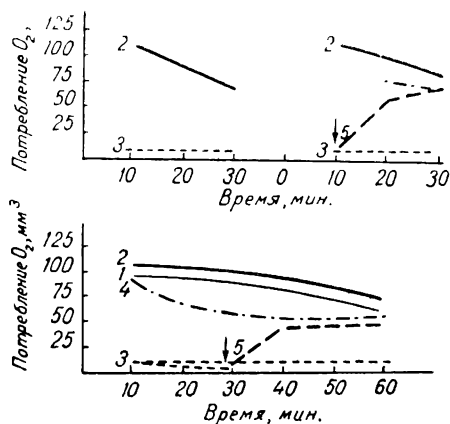


Рис. 28. Влияние CaCl_2 и HgCl_2 на активность глюкозооксидазы (активность определялась манометрическим методом при 30°C в атмосфере кислорода):

1 — контроль; 2 — глюкозооксидаза + CaCl_2 0,01M; 3 — глюкозооксидаза + HgCl_2 0,0001M; 4 — глюкозооксидаза + HgCl_2 + CaCl_2 ; 5 — после инкубации с HgCl_2 и добавления CaCl_2 .

Были проведены исследования, имевшие целью определить влияние на ферментативную активность глюкозооксидазы некоторых сульфгидрильных и карбонильных ядов и одного из активаторов глюкозооксидазы — хлористого кальция. Опыты проводились в аппарате

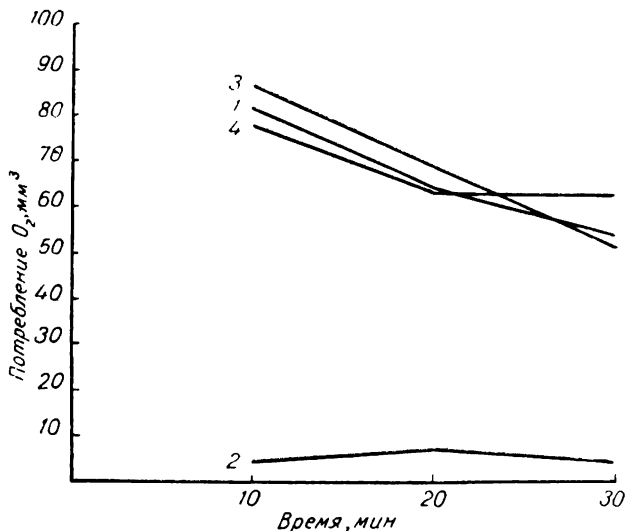


Рис. 29. Влияние NH_4Cl и HgCl_2 на активность глюкозооксидазы (активность определялась манометрическим методом при 30°C в атмосфере кислорода):

1 — контроль; 2 — 10^{-4}M HgCl_2 ; 3 — $10^{-3} \text{M NH}_4\text{Cl}$; 4 — $10^{-1} \text{M HgCl}_2 + 10^{-3} \text{M NH}_4\text{Cl}$.

Варбурга, активность фермента определялась по потреблению кислорода. Результаты этих исследований приведены на рис. 27

Как видно из рисунка, HgCl_2 в концентрации $1 \cdot 10^{-1}$ и $1 \cdot 10^{-4}$ значительно (на 95 и 68% соответственно) тормозит активность глюкозооксидазы. Присутствие в инкубационной смеси хлористого кальция ($0,01 \text{M}$) значительно уменьшает торможения, вызванные HgCl_2 . Более того, если инкубацию проводить в присутствии HgCl_2 ($0,001 \text{M}$), а затем добавить раствор CaCl_2 , наблюдается снятие торможения активности, вызванного HgCl_2 (рис. 28). Такой же эффект наблюдается после прибавления NH_4Cl (рис. 29).

В пользу того, что вещества, оказывающие активизирующее действие на глюкозооксидазу, снимают торможение, вызванное SH-ядами, свидетельствуют и такие опыты.

Малмстадт и Годианоус [59] описали спектрофотометрический метод определения глюкозы в крови с помощью глюкозооксидазы. Метод основан на том, что аммониймолибдат специфически катализирует окисление KJ в KJ_3 за счет H_2O_2 , образующейся в результате окисления глюкозы глюкозооксидазой. KJ_3 имеет характерный спектр с пиком при 353 $m\mu$. По количеству KJ_3 можно судить о количестве возникающей H_2O_2 , а следовательно, о количестве окислившейся глюкозы и потребленного O_2 .

Середа приспособил метод Малмстадта к определению активности глюкозооксидазы в наших препаратах. Используя этот метод, мы пытались проверить влияние SH-ядов и активаторов на активность глюкозооксидазы. Оказалось, что в указанных условиях торможение активности глюкозооксидазы можно наблюдать только в присутствии $HgCl_2$ и то только в первые $1/2$ —1 минуту. Затем торможение падает. В указанных условиях действия ПХМБ наблюдать вообще не удавалось, так как при его прибавлении раствор мутнел и определение изменения оптической плотности исключалось. Уменьшение же торможения активности глюкозооксидазы, вызванного хлористой ртутью, можно было предположительно объяснить действием ионов аммония в буфере. Предположение было подтверждено опытами, которые показали, что прибавление к инкубационной смеси аммоний-молибдатного буфера вызывает повышенное потребление кислорода по сравнению с контрольными пробами.

Чтобы исключить нон аммония, мы несколько изменили инкубационную смесь, а именно: заменили аммониймолибдатный буфер ацетатным, а в качестве катализатора, способствующего окислению KJ в KJ_3 за счет перекиси водорода, использовали пероксидазу. Реакционная смесь содержала 1 мл 0,1M ацетатного буфера pH 5,8, содержащего 10 $мкг$ препарата пероксидазы из хрена, 0,5 мл 2%-ного раствора KJ, 0,1 мл 15%-ного раствора глюкозы, 0,1 мл раствора глюкозооксидазы (0,2—0,5 $мкг$ белка) и воды до объема 3 мл.

Как видно из рис. 30, в этих условиях имеет место накопление КЛЗ. В присутствии хлористой ртути ($3,6 \times 10^{-4} M$), а в еще большей степени в присутствии такой же молярной концентрации парахлормеркурийбензоата

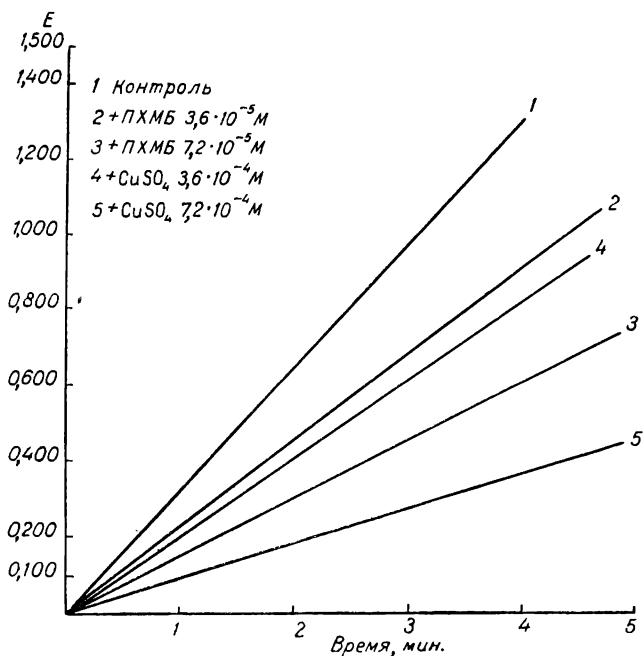


Рис. 30. Влияние сульфгидрильных ядов на активность глюкозооксидазы.

(ПХМБ) наблюдается торможение глюкозооксидазной реакции. Влияния активаторов (например, $CaCl_2$) в этих условиях не удается наблюдать, так как при их прибавлении раствор мутнеет.

Приведенные данные, нам кажется, с достаточной достоверностью свидетельствуют о том, что торможение активности глюкозооксидазы SH-ядами является конкурентным по отношению к глюкозе и некоторые катионы (например, Ca^{++} , NH_4^+) и анионы (Cl^-), которые ранее были описаны как активаторы глюкозооксидазы, обладают как активирующим, так и стабилизирующим действием на активность глюкозооксидазы (по отношению к SH-ядам).

Таким образом, метод получения очищенных препаратов глюкозооксидазы из культуральной жидкости *P. vitale* [38—41] является довольно простым, не требует дефицитных и дорогостоящих реактивов (все основные реактивы подлежат регенерации) и обеспечивает получение сухих очищенных препаратов глюкозооксидазы, которые не содержат ни каталазы, ни других ферментов. Препараты обладают высокой ферментативной (Q_{O_2} , порядка 200 000) и антибиотической (титр 1 80 000 000) активностью.

Из сухих очищенных препаратов глюкозооксидазы простым путем можно получить этот фермент в кристаллическом виде. Кристаллическая глюкозооксидаза является гомогенной при исследованиях в ультрацентрифуге и при электрофоретических исследованиях.

Изучены некоторые свойства кристаллических и очищенных препаратов глюкозооксидазы. Установлено, что некоторые катионы и анионы в определенной молярной концентрации повышают ферментативную и антибиотическую активность глюкозооксидазы.

Установлено, что сульфгидрильные и карбонильные яды тормозят активность глюкозооксидазы. Катионы Ca^{++} и NH_4^+ и анион Cl^- , повышающие активность глюкозооксидазы, в молярных концентрациях, превышающих молярную концентрацию сульфгидрильных ядов, частично или полностью снимают тормозящее действие последних.

Сопоставлены различные методы определения активности глюкозооксидазы и сделано заключение о достоинствах и недостатках каждого из них.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ ИЗ *PENICILLIUM VITALE*

Изучению антибактериальных свойств культуральной жидкости гриба *Penicillium vitale*, содержащей фермент глюкозооксидазу, посвящено большое количество работ. Они относятся главным образом к периоду внедрения нативного микроцида в медицинскую практику (1947—1949 гг.) как лечебного средства, проявляющего высокую активность по отношению к широкому кругу грамположительных, грамотрицательных и

Таблица 18

**Антибактериальные свойства
жидкого микроцида**

Микроб	Минимально действующая концентрация жидкого микроцида
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	1:30000
<i>Staphylococcus aureus</i> 64 (пенициллиноустойчивый)	1:36000
<i>Bacterium coli</i>	1:16000
<i>Proteus vulgaris</i>	1:10000
<i>Bacterium prodigiosum</i>	1:32000
<i>Bac. megatherium</i>	1:20000
<i>Mycobacterium K</i>	1:20000

кислотоустойчивых микроорганизмов, патогенных для человека, животных и растений.

Первые работы Пидопличко и Билай [28, 35, 36] дают сравнительную характеристику антибактериальной активности различных типов

P. vitale по отношению к *Staphylococcus aureus* 209. Ими показано, что культуральные жидкости отдельных штаммов этого гриба задерживали рост стафилококка в разведении 1 40 000 — 1 1 000 000 (при титровании на мясопептонном бульоне с 1% глюкозы).

Антибактериальные свойства жидкого микроцида к настоящему времени достаточно хорошо изучены. Жидкий микроцид средней активности, по данным Пидопличко и Билай, задерживал рост микроорганизмов в высоких разведениях (табл. 18).

Изучением спектра действия микроцида занимались Шур-Шульц и Марусенко [60, 61], которые показали, что препарат оказывает бактериостатическое и бактерицидное действие на стафилококки, стрептококки, дизентерийную, тифозную, паратифозную, кишечную па-

Таблица 19

**Минимально бактерицидно
действующая доза нативного
микроцида на различные виды
микробов**

Бактерии	Титр
Стафилококки 209	10^{-8} — 10^{-10}
Стафилококки, другие штаммы	10^{-4} — 10^{-6}
Стрептококки	10^{-3} — 10^{-5}
Палочка дизентерии Шига	10^{-4} — 10^{-5}
Палочка дизентерии Флекснера	10^{-3} — 10^{-4}
Палочка брюшного тифа	10^{-3} — 10^{-5}
Палочка паратифа В	10^{-3}
Палочка паратифа Бреслау	10^{-4}
Палочка пневмонии Фридляндера	10^{-4}
Кишечная палочка	10^{-5}
Дифтерийная палочка	10^{-2}
Сенная палочка	10^{-2}
Протей	10^{-1}
Синегнойная палочка	10^{-2}

лочки и на капсульные бактерии (палочки Фриша и Фридляндера); слабее микроцид действует на дифтерийную палочку, протей, синегнойную палочку и чрезвычайно слабое действие оказывает на представителей анаэробных микробов (табл. 19).

Интересно отметить, что, по данным этих авторов, микроцид обладает задерживающим рост действием на грибы-дерматофиты: *Microsporum lanosum*, *Trichophyton gypsum* (минимально действующая доза равна 10^{-4} — 10^{-5}).

После длительных и широких испытаний в лечебных учреждениях микроцид с 1950 г. был внедрен в широкую медицинскую практику как наружное лечебное средство при различных острых воспалительных процессах и гнойно-хирургических заболеваниях. Он обладает высоким бактерицидным действием на микрофлору ран и заметным стимулирующим действием на процессы регенерации тканей.

Микроцид не оказывает токсического действия на раневую поверхность и по сравнению с другими лечебными средствами значительно сокращает сроки лечения многих хирургических заболеваний [26, 28, 35, 62, 63, 64].

Действие микроцида тем быстрее и эффективнее, чем более полно его соприкосновение с пораженными тканями, чем больше открыт для него и кислорода доступ в глубину этих тканей.

О морфологических и биологических изменениях стафилококков, стрептококков и некоторых возбудителей бактериозов растений под действием микроцида свидетельствуют исследования ряда авторов: Шур-Шульц и Марусенко, Степанюк, Бельтюковой, Шляховой и др.

Степанюк [65, 66] установила, что морфологические и тинкториальные изменения, обнаруженные в мазках из культур разного возраста на бульоне с содержанием бактериостатических доз микроцида, оказались идентичными с описанными рядом авторов (Хингук, Флори, Ермольева, Ваксман и др.) у гноеродных кокков, возникшими под влиянием других антибиотиков.

При наличии высоких бактериостатических и бактерицидных свойств микроцид вызывает нарушение процессов деления и роста стафилококков и стрептококков. В результате нарушения обмена веществ микро-

бов происходят глубокие биологические изменения, приводящие к ослаблению или потере гемолитических, фибринолитических свойств у стрептококков и плазмокоагулирующих — у стафилококков.

Микроцид подавляет ферментативную способность стрептококков, вызывая ослабление ферментации глюкоидов, а стафилококки при его воздействии теряют способность синтезировать яркий пигмент.

По данным Шляховой [67, 68], микроцид может в зависимости от вида бактерий, испытываемой концентрации и продолжительности воздействия оказывать бактерицидное, бактериостатическое и литическое действие на микробную клетку (табл. 20).

Опытным путем установлено, что микроцид оказывает антибактериальное действие на бактериальные клетки любого возраста (от 6 до 72 часов), но его максимальная активность проявляется в отношении молодых, физиологически активных бактериальных клеток, находящихся в стадии активного роста и размножения.

Морфологические изменения характеризуются увеличением размера клеток с последующим лизисом их. У стафилококков и стрептококков под воздействием микроцида нарушается или теряется способность окрашиваться по Граму. Все увеличенные клетки теряют свойство воспринимать щелочную синьку и краски, применяемые по методу Грама. Такое глубокое действие микроцида на стафилококки, стрептококки и другие микроорганизмы имеет большой теоретический и практический интерес.

Широкое применение антибиотиков в медицинской практике привело к появлению высокоустойчивых рас микроорганизмов (особенно стафилококков) по отношению к пенициллину и ряду других антибиотиков и возникновению трудностей, с которыми встречаются практические врачи при лечении заболеваний, вызываемых устойчивой микрофлорой.

Грифит и Остендер [69] в опытах *in vitro*, проверяя чувствительность 794 штаммов стафилококков по отношению к пенициллину и девяти другим антибиотикам, установили, что к пенициллину были устойчивыми 80,2% изученных штаммов, к тетрациклину — 65,4%, эритромицину — 46%, хлорамфениколу — 21% и т. д.

Зельманович и Докучаева [70] в процессе исследо-

Время проявления бактерицидного действия нативного микроцида
(по Шля)

Бактерии	Количество микробных клеток на 1 мл среды	Разведение		
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
Стафилококк 209	100000000	36	+	+
	10000000	9	18	18
	1000000	5	9	9
	100000	3	3	5
	10000	3	3	5
	1000	3	3	4
	100	3	3	4
Палочка брюшного тифа 62	100000000	32	+	+
	10000000	9	+	+
	1000000	5	9	18
	100000	3	4	12
	10000	3	4	12
	1000	3	4	5
	100	3	3	5

Обозначения: + наличие роста микроорганизмов; цифра — время

вания гноя воспалительных очагов выделили 173 культуры стафилококков, из которых 63,1% оказались стойкими по отношению к пенициллину.

В ряде литературных источников большое внимание уделяется микрофлоре, которая высевается с поверхности ран после ожогов, при лечении которых применялись антибиотики.

Монкриф и Ривера [71], исследуя микрофлору ран, образовавшихся после ожогов, показали значительную смену чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам. Из 229 штаммов *Micrococcus pyogenes*, выделенных с поверхности ожогов в 1950 г., были чувствительны к пенициллину 83,3%, тогда как в 1955 г. из 789 штаммов этого микроба чувствительными были только 3,7%.

Эти и другие данные свидетельствуют о том, что изыскание способов борьбы с возникновением резистентности микроорганизмов к антибиотикам и поиски препаратов, действующих на устойчивые формы, является одной из первостепенных задач.

В зависимости от концентрации микробных клеток и препарата ховой)

нативного микроцида						Контроль
10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
5	18	+	+	+	+	+
4	4	4	4	4	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+

проявления бактерицидного действия в часах.

В этом отношении несомненный интерес представляют препараты нативной (глюкозооксидазы в культуральной жидкости) и очищенной глюкозооксидазы, обладающие широким спектром антимикробного действия.

В ранних работах Пидопличко и Билай [28, 35, 36] имеются указания на высокую чувствительность к микроциду (глюкозооксидазе) пенициллиноустойчивого стафилококка (в разведении микроцида 1 36 000).

При исследовании бактериальной флоры, гнойных процессов Визирь [72] выделял стафилококки и стрептококки с высокой резистентностью к пенициллину и в результате применения микроцида получил хороший лечебный эффект.

Более детальные исследования по влиянию микроцида и очищенных препаратов глюкозооксидазы на устойчивые к пенициллину и ряду других антибиотиков стафилококки были проведены Никольской [32, 33]. В результате сравнительного изучения действия микроцида на чувствительные и устойчивые к пенициллину

стафилококки (с минимальной чувствительностью к пенициллину 4000 ед/мл) ею получены данные, показывающие, что микроцид оказывает на последние бактериостатическое действие в большем разведении, чем на стафилококки, чувствительные к пенициллину, но бактерицидное действие препарата по отношению к испытанным тестам почти одинаковое. Та же закономерность сохраняется при разведении микроцида в 2, 5, 10 раз (табл. 21, 22).

Таблица 21

Изменение титра микроцида по отношению к *Staph. aureus* 209 и *Staph. aureus* 209 Р (пенициллиноустойчивый) в зависимости от степени его разведения

Микроцид	<i>Staph. aureus</i> 209		<i>Staph. aureus</i> 209 Р	
	БС	БЦ	БС	БЦ
Неразведенный	1:50000	1:40000	1:64000	1:32000
В разведении 1:2	1:20000	1:20000	1:40000	1:16000
В разведении 1:5	1:4000	1:4000	1:16000	1:4000
В разведении 1:10	1:1000	1:1000	1:8000	1:1000

Условные обозначения: БС—бактериостатическое действие; БЦ—бактерицидное действие.

Заслуживают внимания данные, полученные при комбинированном воздействии микроцида и пеницилина на тест-культуры стафилококков (табл. 23). Из табл. 23 видно, что комбинированное применение микроцида с пенициллином эффективнее действует на *Staph. aureus* 209, чем каждый антибиотик в отдельности в той же дозе, которая входила в смесь. Это особенно четко выступает при определении действия смеси антибиотиков на пенициллиноустойчивый стафилококк, где один пенициллин не задерживает роста стафилококка, тогда как один микроцид задерживает рост пенициллиноустойчивого стафилококка в разведении 1 : 32 000.

Сравнительная проверка чувствительности золотистого стафилококка к очищенным препаратам глюкозооксидазы показала, что при плотности посева 100 000

Т а б л и ц а 22

Сравнительная активность нативного и очищенных препаратов глюкозооксидазы, полученных из *P. vitale* 1312/140 IV, по отношению к *Staph. aureus* 209

Номер опыта	Штамм гриба	pH	Титр культуральной жидкости по отношению к <i>Staph. aureus</i> 209	Потребление O_2 на 1 мл культуральной жидкости за 30 мин., мл*	Выход препарата из литра культуральной жидкости, мг	Содержание белка, %	Q_{O_2} очищенных препаратов	Титр очищенных препаратов по отношению к <i>Staph. aureus</i> 209
1	1312/140 IV	3,53	1:50000	3500	160	40	207000	—
2	»	3,53	1:24000	6440	31	90	200000	1:40000000
3	»	3,36	1:50000	5992	60,6	90	277200	—
4	»	3,53	1:50000	6705	60	82,4	207200	1:40000000
5	»	3,45	1:32000	—	82	86	250000	1:80000000
6	»	3,53	1:20000	6173	60,7	90	251740	1:80000000

Т а б л и ц а 23

Сравнительное изучение эффективности микроцида и пенициллина, взятых вместе и раздельно, на *Staph. aureus* 209 и пенициллиноустойчивый стафилококк *Staph. aureus* 209 Р*

	Антибиотики	<i>Staph. aureus</i> 209			<i>Staph. aureus</i> 209 Р*		
		BC		БЦ	BC	БЦ	БЦ
Микроцид + пенициллин 2000 ед/мл		1:50000		1:24000	1:64000		1:50000
Микроцид + пенициллин 1000 ед/мл		1:32000		1:20000	1:50000		1:24000
Микроцид + пенициллин 500 ед/мл		1:20000		1:16000	1:40000		1:32000
Микроцид + физиологический раствор		1:16000		1:10000	1:32000		1:16000
Пенициллин 2000 ед/мл + физиологический раствор		1:32000		1:16000	0		0
Пенициллин 1000 ед/мл + физиологический раствор		1:16000		1:10000	0		0
Пенициллин 500 ед/мл + физиологический раствор		1:10000		1:4000	0		0

Условные обозначения: О — отсутствие задержки роста стафилококка; BC — бактериостатическое действие; БЦ — бактерицидное действие.

* Пенициллиноустойчивый стафилококк (штамм 209 Р) с минимальной чувствительностью к пенициллину 4000 ед/мл получен из Всесоюзного научно-исследовательского института антибиотиков.

микробных тел на 1 мл 1%-ного глюкозного бульона чувствительных к пенициллину и устойчивых к ряду антибиотиков стафилококков задержка роста их наблюдается в больших разведениях глюкозооксидазы порядка 1 40 000 000—1 80 000 000 и выше (табл. 24).

При проверке чувствительности к глюкозооксидазе золотистых стафилококков, устойчивых не к одному, а к нескольким антибиотикам, методом серийных разведений на 1%-ном глюкозном бульоне получены аналогичные данные, как и для стафилококков, устойчивых только к одному антибиотику (табл. 25).

Таблица 24

Антибиотическое действие очищенных препаратов глюкозооксидазы на чувствительные и устойчивые к ряду антибиотиков стафилококки

Тест-микроорганизм и его характеристика	Разведения глюкозооксидазы, задерживающие рост стафилококков			
	Бактериостатическое действие		Бактерицидное действие	
	Титр	Количество препарата, мкг	Титр	Количество препарата, мкг
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 (чувствительный к пенициллину)*	1:80000000	0,012	1:40000000	0,025
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 Р (устойчивый к пенициллину 3000 ед/мл)	1:80000000	0,012	1:20000000	0,05
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 (устойчивый к стрептомицину 1000 ед/мл)	1:80000000	0,012	1:40000000	0,025
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 (устойчивый к эритромицину 100 ед/мл)	1:40000000	0,025	1:20000000	0,05
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 (устойчивый к тетрациклину 50 ед/мл)	1:80000000	0,012	1:80000000	0,012
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 (устойчивый к новобиоцину 200 ед/мл)	1:160000000	0,006	1:80000000	0,012

* Культуры стафилококков, устойчивых к антибиотикам, получены из Всесоюзного научно-исследовательского института антибиотиков (ВНИИА).

**Антибиотическое действие очищенных препаратов глюкозооксидазы
на стафилококки, устойчивые к нескольким антибиотикам**

Тест-микроорганизм и его характеристика	Разведения глюкозооксидазы, задерживающие рост стафилококков			
	Бактериостатическое действие		Бактерицидное действие	
	Титр	Количество препарата, мкг	Титр	Количество препарата, мкг
<i>Staph. aureus</i> *, устойчивый к пенициллину 100 ед/мл, стрептомицину 10 ед/мл, левомецетину 100 ед/мл, биомицину 100 ед/мл . .	1:20000000	0,05	1:20000000	0,05
<i>Staph. aureus</i> , устойчивый к стрептомицину 2000 ед/мл, левомецетину 2000 ед/мл, биомицину 200 ед/мл, мицерину 2000 ед/мл, полимиксину свыше 2000 ед/мл; чувствительный к пенициллину . .	1:80000000	0,012	1:40000000	0,025
<i>Staph. aureus</i> , устойчивый (свыше 2000 ед/мл) к стрептомицину, пенициллину, левомецетину, биомицину, мицерину, полимиксину . .	1:40000000	0,025	1:20000000	0,05
<i>Staph. aureus</i> , устойчивый к стрептомицину 2000 ед/мл, левомецетину 2000 ед/мл, биомицину 2000 ед/мл и пенициллину свыше 2000 ед/мл; чувствительный к мицерину . .	1:20000000	0,05	1:10000000	0;1
<i>Staph. aureus</i> , устойчивый к пенициллину 200 ед/мл, стрептомицину 2000 ед/мл, левомецетину 200 ед/мл, мицерину 2000 ед/мл, полимиксину свыше 2000 ед/мл	1:80000000	0,012	1:80000000	0,012

* Культура стафилококков и их характеристика получены из отдела патогенных микроорганизмов Института микробиологии АН УССР.

Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что глюкозооксидаза в опытах *in vitro* обладает высокими антибиотическими свойствами по отношению к стафилококкам, устойчивым к ряду антибиотиков.

Сахновская [73], изучая устойчивость 112 патогенных штаммов стафилококков, выделенных при различных гнойных заболеваниях, не обнаружила резистентных культур к микроциду, антибактериальный титр которого по отношению к *Staph. aureus* 209 был равен 1 64 000.

В условиях лаборатории после 10—11 пассажей на средах с возрастающими концентрациями микроцида автором были получены варианты, обладающие значительной резистентностью к микроциду, но они сохраняли высокую чувствительность к пенициллину. При частых и многократных пересевах у полученных вариантов резистентность к микроциду утрачивалась.

О высокой чувствительности к микроциду искусственно адаптированных к ряду антибиотиков дизентерийных палочек сообщила Мандрик [74, 75], которая показала, что у резистентных к стрептомицину дизентерийных палочек устойчивость к микроциду снизилась в 50—100 раз по сравнению с исходными культурами, у резистентных к биомицину — в 10—100 раз, у резистентных к саназину — в 20—100 раз, у резистентных к левомицетину — в 5—40 раз и у резистентных к синтомицину — в 5—100 раз.

Таким образом, у дизентерийных палочек, резистентных к указанным антибиотикам, устойчивость к микроциду снизилась в десятки и даже сотню раз.

При изучении антибактериальной активности микроцида и ряда других антибиотиков по отношению к двенадцати чувствительным штаммам трех видов дизентерийных палочек (пяти штаммам Флекснера, шести штаммам Зонне и одному штамму Григорьева—Шига) с целью возможного использования данных антибиотиков для борьбы с бактериальной дизентерией Мандрик [76] установила, что микроцид оказывает бактериостатическое действие на испытанные тесты в разведении от 1 10 000—1 25 000 до разведения 1 50 000.

Следует отметить, что усиление бактериостатической и бактерицидной активности по отношению к дизенте-

рийным палочкам особенно заметно проявлялось в случаях комбинированного действия таких антибиотиков, как левомицетин, синтомицин, стрептомицин и саназин, с антибиотиками местного применения, особенно с микроцидом.

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что микроцид и полученные из него очищенные препараты глюкозооксидазы, обладающие широким спектром антибиотического действия на грамположительные, грамтрицательные и устойчивые к ряду антибиотиков микроорганизмы, найдут еще более широкое применение в хирургии и других областях медицины.

Интересные исследования проведены Бельтюковой [77, 78] по влиянию микроцида на ряд возбудителей бактериозов растений. Ею установлено, что микроцид оказывает явно выраженное антибиотическое действие на такие фитопатогенные бактерии: *B. coronafaciens*, *B. tabacum*, *B. andropogonis*, *B. malvacearum*, *B. vesicatorium*, *B. lachrymans*, *B. phaseoli*, *B. michiganense*, *B. medicaginis* var. *phaseolicola*, *B. campestre*, *B. herbiicola*, *B. panici* и другие.

Наиболее чувствительной к микроциду оказалась группа таких желтопигментных бактерий, как *B. phaseoli*, *B. vesicatorium*, *B. malvacearum*, *B. phaseoli* var. *fuscans*, а также некоторые штаммы *B. coronafaciens*. Препарат действует на фитопатогенные бактерии бактерицидно и бактериостатически.

При проверке влияния микроцида на энергию прорастания и всхожесть (%) семян проса, пшеницы и фасоли было показано, что микроцид не только не оказывает вредного влияния на них, а наоборот, во многих случаях даже повышает энергию их прорастания и всхожести при явно благоприятном влиянии на корневую систему.

При попытке применять микроцид в качестве протравителя семян хлопчатника против гоммоза в условиях лабораторного опыта удалось получить некоторые снижения заболеваемости всходов хлопчатника гоммозом.

При постановке опытов в полевых условиях по обеззараживающему действию микроцида на семена хлопчатника против гоммоза и на семена фасоли против бактериального ожога получены результаты, свидетель-

ствующие о том, что микроцид обладает бесспорным обеззараживающим действием.

Антибиотик оказал положительное влияние на энергию прорастания и всхожесть кок-сагыза, способствуя развитию и оздоровлению растений. Обработка черенков кок-сагыза микроцидом повышает их приживаемость с уменьшением способности к загниванию. В результате обработки черенков микроцидом получена прибавка урожая в полевых условиях на 20—30% в зависимости от варианта опыта.

Эти данные показывают, что препараты, содержащие глюкозооксидазу, должны найти более широкое применение в борьбе с бактериозами сельскохозяйственных растений.

Таким образом, изучение антибактериальных свойств микроцида по отношению к грамположительным, грамотрицательным, кислотоустойчивым и антибиотикоустойчивым микроорганизмам показало, что он задерживает их рост в высоких разведениях, оказывая бактерицидное, бактериостатическое и литическое действие на микробную клетку. Микроцид является мощным фактором, вызывающим изменчивость гноеродных кокков с последующим лизисом их.

Определено ценное качество микроцида — его способность задерживать рост микроорганизмов, устойчивых к ряду антибиотиков в большем разведении по сравнению с исходными (не адаптированными) культурами. Это особенно наглядно выступает при проверке чувствительности таких микроорганизмов к очищенным препаратам глюкозооксидазы.

Изучение антимикробных свойств жидкого препарата микроцида и очищенных препаратов глюкозооксидазы позволило широко внедрить микроцид как лечебный препарат при раневых инфекциях, ожогах, обморожениях, в стоматологической и отоларингологической практике.

К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

В качестве медицинских средств, как показали данные многолетней медицинской практики в области применения антибиотиков, более эффективными являются

антибиотические лечебные препараты, обладающие сравнительно широким антибактериальным спектром действия, не вызывающие образования устойчивых форм, обладающие стимулирующим действием на регенеративные процессы пораженных органов и тканей. Этим требованиям, как показали результаты более чем десятилетнего широкого применения в медицинской практике, в значительной степени соответствует жидкий микрод (нативная глюкозооксидаза).

Глюкозооксидаза является мощным антибиотиком, механизм действия которого, по нашему мнению, еще продолжает оставаться не вполне выясненным.

Мы не разделяли и не можем разделять сейчас мнения ряда авторов о том, что механизм антибиотического действия глюкозооксидазы сводится к бактерицидному действию образуемой при окислении глюкозы перекиси водорода. Как результаты наших прежних работ, так и полученные новые данные свидетельствуют о том, что антибактериальные свойства глюкозооксидазы из *P. vitale* представляют, по-видимому, новый тип механизма действия на бактериальную клетку. В развитие этого положения позволим остановиться только на двух фактах: большей чувствительности к глюкозооксидазе пенициллиноустойчивых стафилококков по сравнению с пенициллиночувствительными и почти полном отсутствии привыкания к воздействию глюкозооксидазы различных бактерий и активности ее в отношении, например, стафилококков, устойчивых к ряду антибиотиков.

Объяснимы ли эти факты только воздействием перекиси водорода, образуемой при окислении ферментом глюкозы?

В свете этих данных и вопрос о механизме антибактериального действия антибиотиков глюкозооксидазной природы, несомненно, требует дополнительных исследований.

Во всей зарубежной литературе существует единое мнение о том, что антибиотическая активность глюкозооксидазных антибиотиков обуславливается перекисью водорода, образующейся в процессе окисления глюкозы глюкозооксидазой. Это мнение основывается на таких данных: глюконовая кислота не обладает антибактериальным действием; перекись водорода тормозит

рост микроорганизмов; в присутствии каталазы, разрушающей перекись водорода, антибиотическая активность глюкозооксидазных антибиотиков уменьшается [12, 13]. Кроме того, данные Шалес [48] свидетельствуют о том, что минимальное количество перекиси водорода, которое тормозит рост стафилококка после 24-часовой инкубации; составляет 0,0021 %.

Однако, как показала Диденко [50], второй продукт окисления глюкозы — δ -лактон глюконовой кислоты — также способствует увеличению антибиотической активности глюкозооксидазы. Это свидетельствует в пользу того, что нельзя объяснить антибиотического действия глюкозооксидазных антибиотиков только действием перекиси водорода. Об этом же говорят и наши опыты [52], в которых мы определяли количество перекиси водорода в пробирках титрационного ряда (через 24 часа инкубации). Эти опыты показали (табл. 17), что, как правило, в последних пробирках титрационного ряда, в которых рост микроорганизмов полностью заторможен, количество перекиси водорода низкое — значительно ниже, чем то, которое, по литературным данным, тормозит развитие микроорганизмов. Кроме того, было обнаружено, что в присутствии активирующих количеств хлористого кальция в пробирках, где рост стафилококка заторможен, перекись водорода часто полностью отсутствовала либо была только в виде следов. Это же наблюдалось при прибавлении δ -лактона глюконовой кислоты. Антибиотическая активность повышалась, и в то же время в последних пробирках ряда, где отсутствовал рост микроорганизмов, перекиси водорода не было совсем или были лишь следы ее.

Эти данные, как нам кажется, свидетельствуют о том, что нельзя сводить антибиотическое действие глюкозооксидазы только к действию перекиси водорода и что, очевидно, δ -лактон глюконовой кислоты также играет определенную роль в антибиотическом действии глюкозооксидазы.

Касаясь механизма антибактериального действия глюкозооксидазы, следует остановиться на работе Монова и Нейфаха [54]. Эти авторы, как и Гулый, Шур-Шульц, Дегтярь [52], берут под сомнение положение зарубежных авторов о том, что антибактериальное действие глюкозооксидазы обусловлено только бактерицид-

ным действием перекиси водорода, образующейся при окислении глюкозы. Монахов и Нейфах считают, что едва ли будет правильным искать объяснение антибактериальных свойств фермента-антибиотика в его каталитическом действии, и высказывают предположение, что две различные функции фермента-антибиотика обусловлены различными активными центрами белковой молекулы. Нам кажется, что для такого предположения нет никаких оснований. Многократная проверка ферментативной и бактериостатической активности препаратов глюкозооксидазы показала, что обе эти активности тесно связаны: препараты с более низкой ферментативной активностью обладают, соответственно, и более низкой бактериостатической активностью, и наоборот—обладающие более высокой ферментативной активностью—соответственно и более высокой бактериостатической (табл. 26).

Т а б л и ц а 26

Антибиотическая и ферментативная активность очищенных препаратов глюкозооксидазы по отношению к *Staph. aureus* 209

Номер препарата	Условия выращивания гриба	Содержание белка	Ферментативная активность Q_{O_2}	Антибиотическая активность	
				Титр	Количество препарата, тормозящее рост, мкг
69	Поверхностное	90	149202	1:66400000	0,015
70	»	—	218829	1:66400000	0,015
71 ₁	В ферментере	26,5	55046	1:640000	1,6
71 ₂	В колбах на качалке	27,5	39940	1:640000	1,6
75 ₂	Поверхностное	90	226566	1:80000000	0,012
76	»	86	216580	1:80000000	0,012
77	В колбах на качалке	31,95	3849	1:4000000	2,5
Импортные препараты различного происхождения					
№ 1		58,7	618	1:200000	5
№ 2		10,3	7571	1:100000	10
№ 3		78	45300	1:4000000	0,25
Препарат С ₃		30,5	9117	1:2000000	0,5

Кроме того, при действии определенных активаторов обе активности изменяются параллельно. Экспериментальные данные, таким образом, говорят, что антибио-

тическая активность глюкозооксидазы неразрывно связана с ее каталитической активностью. Но, очевидно, механизм антибиотического действия глюкозооксидазы требует дальнейших исследований.

ВЛИЯНИЕ ОЧИЩЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ (МИКРОЦИДА) НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ ЗДОРОВОГО ЖИВОТНОГО ОРГАНИЗМА

Положительные результаты клинической проверки лечебного действия очищенных препаратов глюкозооксидазы при ее наружном применении [81, 82], а также результаты многих опытов *in vitro*, показавших, с одной стороны, что глюкозооксидаза действует на очень широкий круг грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а с другой,— что при длитель-

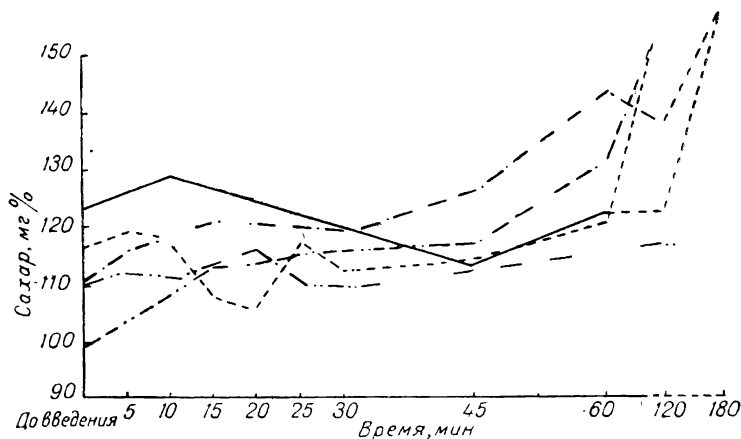


Рис. 31. Влияние глюкозооксидазы на содержание сахара в крови при внутримышечном введении.

ном применении этого антибиотика не образуется устойчивых к нему форм, выгодно отличали этот антибиотик от других. Результаты наших опытов [52] поставили под сомнение выводы других авторов [48] о том, что ответственной за антибиотическое действие глюкозооксидазы является перекись водорода, образующаяся в процессе окисления глюкозы, катализируемом этим ферментом.

Также сомнительным казалось объяснение отрицательных результатов, полученных при применении препаратов глюкозооксидазы (нотатин, пенатин, пенициллин В) *in vivo*, наличием в тканях каталазы, расщепляющей перекись водорода. Исходя из этого, мы считали нужным проверить на здоровых животных влияние введения в их организм препаратов глюкозооксидазы.

Изучение влияния очищенных препаратов глюкозооксидазы на обмен веществ здоровых животных (кроликов) показало, что внутривенное введение препаратов глюкозооксидазы в таких больших дозах, как 20 мг на 1 кг веса (Q_{O_2} препаратов около 100 000), как правило, не вызывало гибели животных.

В противоположность этому внутримышечное введение препарата приводило к гибели животных через 12—28 часов после введения. В первые часы после внутримышечного введения препаратов глюкозооксидазы наблюдалось повышение содержания сахара в крови (рис. 31).

Внутривенное введение препаратов глюкозооксидазы в первую очередь отражается на содержании сахара в крови. Уровень сахара в крови падает уже через 5 мин. после внутривенного введения препаратов глюкозооксидазы (микроцида) в количестве 10—20 мг на 1 кг веса. Максимальное падение уровня сахара в крови наступает через 10 мин. после введения. Затем содержание сахара в крови начинает увеличиваться и достигает исходной величины через 30—45 мин. после введения (рис. 32, а и б) [47, 48, 83, 84].

Вслед за изменением содержания сахара в крови наблюдаются изменения в содержании гемоглобина, часть гемоглобина превращается в метгемоглобин. Увеличение количества метгемоглобина (MetHb) обнаруживается через 10—15 мин. после введения глюкозооксидазы, затем содержание его увеличивается и достигает максимума через 20—30 мин. после введения. Восстановление метгемоглобина в гемоглобин протекает медленно и заканчивается через 2—3 часа (рис. 33) [83, 84]. Некоторое отставание максимального образования метгемоглобина от максимального падения уровня сахара в крови можно объяснить химизмом этих реакций: окисление гемоглобина в метгемоглобин осу-

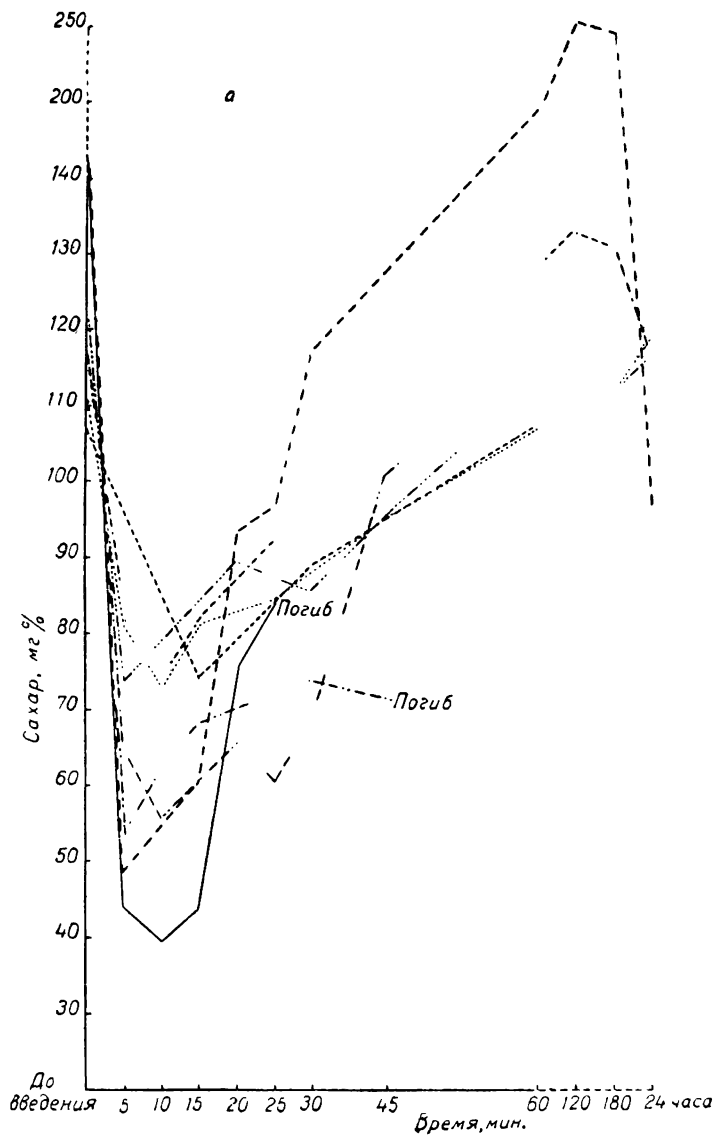
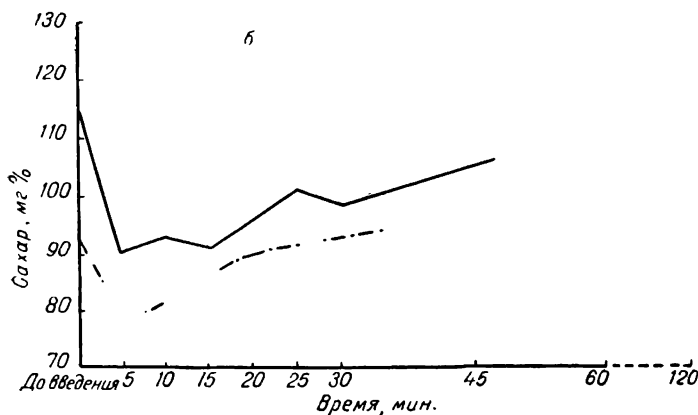


Рис. 32. Влияние глюкозооксидазы на содержание

а — 20 мг на 1 кг живого веса;

ществляется продуктом глюкозооксидазной реакции — перекисью водорода. В первые минуты реакции ее мало и она окисляет незначительное количество гемоглобина. По мере окисления глюкозы образуется большее количество перекиси водорода и большее количество гемоглобина превращается в метгемоглобин. Восстановление метгемоглобина в гемоглобин протекает в организме медленно и отстает от восстановления уровня сахара. Образование метгемоглобина приводит к уменьшению кислородной емкости крови (рис. 34). Максимальное снижение кислородной емкости крови наблюдается через 20—45 мин. после введения глюкозооксидазы — в то время, когда в крови образуется наибольшее количество метгемоглобина. Возвращение кислородной емкости к норме имеет место через 3—4 часа после введения глюкозооксидазы.

Изучение распределения глюкозооксидазы в организме после ее внутривенного введения показало, что во всех органах, кроме печени, она находится столько же времени, как и в крови — несколько больше одного часа. Через три часа после введения глюкозооксидазы не обнаруживается в значительных количествах ни в крови, ни в остальных органах, кроме печени (табл. 27) [83, 85]. Количество фермента, обнаруживаемое в этих органах, соответствует его содержанию в крови орга-



сахара в крови при внутривенном введении:

б — 10 мг на 1 кг живого веса.

нов. В печени глюкозооксидаза появляется в значительных количествах уже через 30 мин. после введения, накапливается, сохраняется длительное время (7—12 часов) и при определенных условиях (достаточное количество глюкозы и кислорода) проявляет здесь высокую

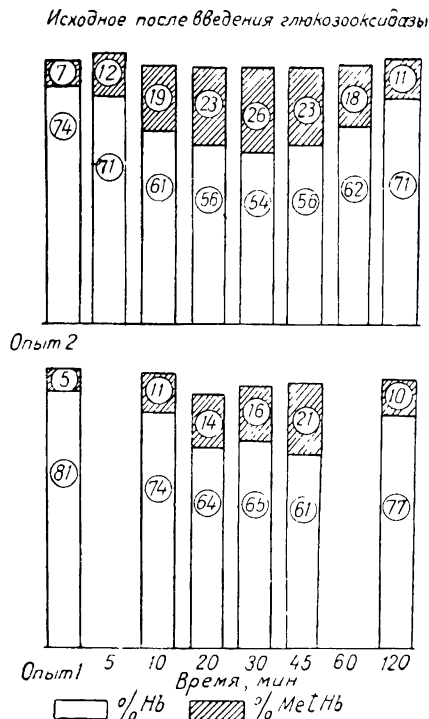


Рис. 33. Образование метгемоглобина при внутривенном введении 20 мг глюкозооксидазы на 1 кг живого веса (содержание Hb и MetHb в %).

ферментативную активность. Глюкозооксидаза, находясь в печени, несколько подавляет собственное дыхание печеночной ткани (что наблюдается в отсутствии глюкозы). В присутствии глюкозы потребление кислорода печеночной тканью, содержащей глюкозооксидазу, значительно повышается (табл. 28) [83, 86]. Исследования показали, что повышенное потребление кислорода печеночной тканью, содержащей глюкозооксидазу, в присут-

Распределение глюкозооксидазы в организме кролика

Дата	Кро- лик	Кролик убит через	Добавочное потребление кислорода (в мл ³) за 30 минут в присутствии глюкозы на 0,5 мл фильтрата из							
			печени	почек	лег- ких	сердца	селе- зенки	крови	скелет- ной мышцы	мо- чи
1950 г.										
19.I	29	1/2 часа	174	15,1	19,2	10,4	29	350		—
15.II	36		175,8	7,36	12	5,0	45,5	104		—
20.II	37		163	8,4	27,7	12,7	41,6	191		—
22.II	38	»	105,4	7,1	24,1	11,72	29,4	403		0
24.II	39	»	71,7	—	30,8	17,4	5,7	180,8		0
16.I	28	1 час	106	7,0	84	—	142,2	—		—
8.II	33		447	25	55,4	38,5	—	335,7	—	—
10.II	34		180,5	5,7	15,9	6,5	27,6	84,1	0	0
13.II	35		383,1	7,3	33,5	10	50,7	18,3	—	—
1.III	42		67,9	—	64	33,4	76,6	181,1		—
3.IV	48	»	111,5	4,5	13,9	7,2	22,7	—	—	—
10.I	27	3 часа	98	8,9	35	15,1	10,6	1,8	0	0
30.I	30	»	400	2,5	2,1	1,1	10,6	0	0	—
4.II	31	»	221	0,2	6,8	3,6	86,4	—	0	—
6.II	32	»	93	0,2	0	0,5	—	0	0	—
24.III	47	»	58,1	2,5	3	6,2	—	+4	0	0
27.II	40	5 часов	45,9	1,2	40,8	7,72	+7,4	0	0	—
2.III	41	»	42,6	0,55	0,8	0,3	3,2	+2	0	0
9.III	43	»	18	1,6	1,6	+5,5	+0,9	0,8	0	—
13.III	44	7 часов	58,5	0	0	0	1,0	—	—	0
14.III	45	12 часов	23,8	0	0	0	0	0	0	0
21.III	61		2,6	0	0	0	0	0	0	0
24.III		24 часа	0	0	0	0	0	0	0	0

ствии глюкозы повышается не за счет активации тканевого дыхания глюкозооксидазой, а за счет того, что печеночная ткань повышает потребление кислорода, катализируемое глюкозооксидазой. Глюкозооксидаза в печени подвергается значительному активированию. Активирующее действие на глюкозооксидазную реакцию оказывают и фильтраты из прокипяченных печеночных экстрактов, а также растворы зольной части печеночных гомогенатов (табл. 29, рис. 15).

Обсуждая полученные данные, следует отметить, что отсутствие лечебного эффекта при введении в организм антибиотиков глюкозооксидазной природы (нотатина, пенатина, пенициллина В) многие склонны были объяснить наличием в тканях каталазы, разрушающей пе-

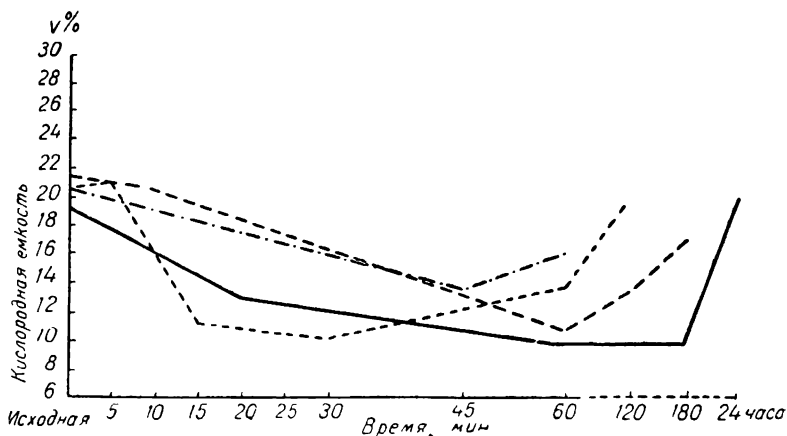


Рис. 34. Изменение кислородной емкости крови кроликов при внутривенном введении глюкозооксидазы.

рекись водорода, которой приписывается антибактериальное действие этих антибиотиков. Основываясь на полученных нами данных, можно считать, что причина ма-

Таблица 28

Влияние глюкозооксидазы на дыхание печеночной ткани*

Потребление кислорода за 30 минут (мл ³) на						
1 мл гомогената	1 мл гомогената + глюкозооксидаза	глюкозооксидазу + глюкоза	1 мл гомогената с глюкозой	1 мл гомогената + глюкоза + глюкозооксидаза	Добавочное потребление за счет добавления	
					глюкозооксидазы	глюкозооксидазы и глюкозы
122,2	55,1	22,0		256,0	-67,6	+133
25,0	12,3	27,3		134,7	-12,7	+109
234,0	178,2	27,3		399,7	-55,0	+194,2
38,0	42,0	17,0	—	269,7	+ 4,0	+230,7
—	—	122,7	84,96	340,9	—	+255,94
		79,8	73,9	112,4		+ 38,5
		25,95	47,0	187,95		+140,25

* Приведено несколько характерных опытов.

лой эффективности этих антибиотиков при введении в организм заключается в кратковременном нахождении глюкозооксидазы в крови (несколько более часа), не-

**Влияние фильтратов из
прокипяченных печеночных
гомогенатов на активность
глюкозооксидазы**

Потребление O_2 за 30 мин. ($мм^3$)		Добавочное потребление O_2 за счет добавления фильтрата
Глюкозо- оксидаза+ +глюкоза	Глюкозо- оксидаза+ +глюко- за+фильт- рат	
79,8	106	+ 26,2
13,5	142,7	+129,2
25	239	+214
25,96	74	+ 47,8
42,7	262,5	+219,8

благоприятных условиях в тканях для проявления действия фермента-антибиотика (низким парциальным давлением кислорода в тканях и низким содержанием в них глюкозы) Условия для действия глюкозооксидазы в организме ухудшаются тем, что глюкозооксидаза, введенная в кровь, вызывает усиленное окисление глюкозы, образование метгемоглобина, уменьшает кислородную емкость крови, в результате чего в организме создается гипоксическое состояние, что отрицательно сказывается на живот-

ном. Все указанные моменты (а не только наличие в тканях каталазы) и обуславливают отрицательные результаты, получаемые при попытках применить глюкозооксидазу с лечебной целью при парентеральном введении ее в организм больных животных. Очевидно, в ряде случаев можно будет применять очищенные препараты глюкозооксидазы для введения в виде клизм и др. При этом необходимо будет обеспечить при введении достаточное содержание глюкозы и кислорода.

ПРИМЕНЕНИЕ ГЛЮКОЗООКИДАЗЫ В МЕДИЦИНЕ И ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Применение глюкозооксидазы для лечебных целей

В 1950 г. микроцид был внедрен в широкую медицинскую практику как наружное лечебное средство и за прошедшее время показал высокую эффективность в различных областях медицины.

Он применяется в качестве наружного средства при лечении свежих и инфицированных ран, ожогов II и III степени, обморожений II и III степени и других гнойно-воспалительных процессов кожи и слизистых оболочек с неизменным успехом.

При лечении ожогов Дзбановский [81] установил, что микроцид обладает ценным свойством — способностью

дезодорировать поверхность ожогов, чего не удалось достичь при использовании других лечебных средств. Как отмечает автор, уже в течение первых двух суток применения микроцида тяжелый запах тления полностью устраняется. При орошении микроцидом поверхности ожога характерно уменьшение вплоть до полного исчезновения количества серозно-плазматических, а затем и гнойных выделений. Наступающее ускоренное очищение обожженной поверхности значительно сокращает время ее подготовки для трансплантации кожи.

Дзбановский указывает, что при лечении микроцидом даже обширных ожогов, достигающих 47 % поверхности тела, был получен положительный результат, в то время как при других способах лечения в подобных случаях наступает летальный исход.

При применении очищенных препаратов микроцида для лечения больных со свеженфицированными ранами, инфицированными ожогами, гранулирующими ранами, гнойно-воспалительными процессами, длительно не заживающими ранами и язвами автор [87] отмечает, что микрофлора ран становится более благоприятной: исчезают многие разновидности кокковой флоры в более ранние сроки по сравнению с применением нативного микроцида, количество микробов в отделяемом значительно уменьшается. Применение очищенного микроцида в растворах показало его несомненную эффективность и целесообразность применения.

Лечебный эффект от применения микроцида при различных заболеваниях Чаругин [88] представил в таблице (табл. 30)

Как видно из таблицы, в большинстве случаев микроцид оказывает благоприятное действие на заживление инфицированных ран и гнойно-воспалительных процессов. Как указывает Чаругин, микрофлора ран уменьшается, снижается гнойное отделяемое, ускоряется появление здоровых грануляций и очищение ран от некротических тканей.

Микроцид оказался эффективным в стоматологии: при язвенном стоматите, при лечении постэкстракционных осложнений, при зубной кисте.

Как показали Вайсблат и Бух-Чечик [89], микроцид весьма эффективен в острых, хронических и даже септических случаях язвенного стоматита. Применение ми-

Лечебный эффект от применения микроцида при различных заболеваниях (по Чаругину)

Заболевание	Результаты применения препарата			Общее число
	Хороший	Удовлетворительный	Плохой	
Инфицированные раны	35	34	4	73
Ожоги	16	9	4	29
Обморожения	1	—	—	1
Флегмоны	17	9	1	27
Абсцессы	11	9	—	20
Карбункулы	3	2	—	5
Маститы	6	4	—	10
Панариции	13	6	—	19
Парапроктиты	4	2	—	6
Открытые переломы	2	1	—	3
Хронические остеомиелиты	2	3	1	6
Туберкулезные свищи	—	1	1	2
Раны (первичная обработка)	8	4	—	12
Язвы	—	3	1	4

кроцида при язвенном стоматите сокращает срок лечения больного и его пребывание в стационаре.

В клинике челюстно-лицевой хирургии [89] микроцид широко применяют для промывания верхнечелюстной пазухи после удаления зуба при остром одонтогенном гайморите, при обработке костной раны, околочелюстных мягких тканей, при травме челюстно-лицевой области.

Наряду с применением жидкого микроцида при лечении ряда стоматологических заболеваний применялся высокоочищенный сухой микроцид (глюкозооксидаза) с хорошим результатом [82].

Исходя из солевого состава нативного жидкого микроцида и концентрации отдельных ионов, при которых наблюдается максимальный активирующий эффект антибактериального действия, для применения глюкозооксидазы с лечебной целью был разработан наполнитель следующего состава: аммоний хлористый — 260 мг, магний хлористый — 100 мг, кальций хлористый — 20 мг, глюкоза — 2,0 г, очищенный препарат глюкозооксидазы — 2 мг.

В 95% случаев положительные результаты получены при лечении микроцидом острых пульпитов [82, 90] и глубокого кариеса [91].

Микроцид является ценным средством борьбы со смешанной инфекцией свищей у костнотуберкулезных больных, ведущим к ликвидации их. Он предупреждает проникновение вторичной инфекции при свежих свищах и тем самым способствует скорейшему их заживлению [92, 93].

Широкое применение микроцид нашел в отолярингологии при ангинах, остром воспалении верхнечелюстной пазухи, после антротомии, общеполостной операции на ухе и других заболеваниях.

Как сообщил Колибаба [94], при введении микроцида в верхнечелюстную полость при остром воспалении исчезновение клинических признаков гайморита отмечено после однократного его применения.

Автор успешно применял микроцид при ряде других заболеваний. Собственные наблюдения и данные других исследователей позволили ему заключить, что антибиотик микроцид является действенным средством для очистки ран, снятия некротических налетов и отторжения некротизированных тканей.

Многочисленные наблюдения показали, что микроцид является ценным лечебным средством местного действия и нашел широкое применение при заболеваниях, вызываемых гноеродными микроорганизмами.

Ценность этого препарата повышается в связи с тем, что он действует на стафилококки, устойчивые к ряду антибиотиков, таких, как пенициллин, стрептомицин, эритромицин, новобиоцин и другие.

Применение глюкозооксидазы для аналитических целей

Высокая специфичность глюкозооксидазы по отношению к глюкозе способствовала использованию этого фермента в качестве специфического реактива для определения глюкозы в крови и других биологических жидкостях.

Впервые глюкозооксидазу применили для специфического манометрического метода определения глюкозы

Кейлин и Хартри [19, 20]. Затем Кестон [95] описал быстрый и простой колориметрический метод определения глюкозы с применением глюкозооксидазы и пероксидазы. Принцип этого метода основан на том, что кислород перекиси водорода, образующейся при окислении глюкозы, катализируемом глюкозооксидазой, в количестве, эквивалентном количеству окислившейся глюкозы, при участии пероксидазы переносится на подходящие хромогенные акцепторы кислорода. Образующиеся при этом окрашенные вещества определяются фотометрически. При отсутствии в системе каталазы их количество строго соответствует количеству образовавшейся перекиси водорода, а следовательно, и количеству окислившейся глюкозы.

Благодаря высокой специфичности глюкозооксидазы по отношению к глюкозе этот метод дает возможность определить «истинную» глюкозу в жидкостях, содержащих другие сахара, которые при определении другими (химическими) методами определяются как глюкоза.

В настоящее время описано большое количество модификаций этого метода и уточнены условия его применения [96—107]. Разработаны также приспособления для быстрого автоматизированного определения глюкозы с применением глюкозооксидазы [108—112]. Чрезвычайно ценным является приспособление глюкозооксидазно-пероксидазного метода для экспрессного определения глюкозы в биологических жидкостях с помощью бумажек, пропитанных раствором этих ферментов. Применение бумажек дает возможность быстро определить содержание глюкозы в крови, моче и других жидкостях и является важным в медицинской практике [113—115]. Реактив, содержащий глюкозооксидазу, также нашел применение для определения глюкозы после ее хроматографического разделения [116].

Следует также напомнить о модификации Мальштадт [59], о которой уже говорилось, основанной на определении KJ_3 , который образуется при окислении KJ перекисью водорода, образующейся в глюкозооксидазной реакции.

Необходимо отметить, что большинство импортных продажных препаратов глюкозооксидазы содержит каталазу и ферменты, окисляющие другие сахара. Это

приводит к необходимости постановки ряда контролей при применении импортных препаратов фермента.

Препараты глюкозооксидазы дают возможность определять другие сахара, имеющиеся в исследуемом объекте, например галактозу, после предварительного окисления глюкозы глюкозооксидазой [117, 118]. Глюкозооксидазный метод применяется также для определения мальтозы [119, 120] и фруктозы в растениях [121].

Как уже отмечалось, полученные из *Penicillium vitale* препараты глюкозооксидазы, очищенные по методу Гулого и Дегтярь [38—41], обладают высокой ферментативной активностью, высокой специфичностью по отношению к β -*D*-глюкозе. Они не содержат ферментов, окисляющих другие сахара и каталазы. Основываясь на этих свойствах отечественных препаратов глюкозооксидазы, Лукомская и Городецкий [122, 123] дали пропись реактива для определения глюкозы в крови с помощью полученных нашим методом препаратов глюкозооксидазы. Согласно их прописи, реактив готовится следующим образом: к 80 мл ацетатного буфера 0,25 М, рН 4,8 добавляют 2 мг сухого препарата глюкозооксидазы и 5 мл раствора кристаллической пероксидазы (раствор содержит 20 мг кристаллической пероксидазы в 100 мл ацетатного буфера). Смесь перемешивают, добавляют 1 мл раствора о-толидина (1% в абсолютном спирте) и доводят объем до 100 мл ацетатным буфером. Реактив готовят за 1—2 часа до употребления. Он может храниться на холоду в темных закрытых склянках в течение нескольких суток. Стандартные растворы глюкозы 50, 100 и 150 мг% готовятся на насыщенном водном растворе бензойной кислоты и сохраняются в холодильнике длительное время.

Для осаждения белков авторы применили 5%-ный раствор $ZnSO_4$ и 0,3N NaOH. Для определения глюкозы в центрифужную пробирку помещают 1,1 мл 0,9%-ного раствора NaCl, 0,4 мл 5%-ного раствора $ZnSO_4$ и 0,4 мл 0,3N NaOH. К смеси добавляют 0,1 мл крови или 0,1 мл стандартного раствора глюкозы. Смесь перемешивают и центрифугируют 5 мин. при 3000 об/мин. На определение берут 1 мл надосадочной жидкости, к нему прибавляют 3 мл рабочего реактива и перемешивают содержание пробирки. Для контроля берут 1 мл воды и 3 мл реактива. Колориметрируют против конт-

роля на фотоколориметре с красным светофильтром через 15—17 мин. По стандартной кривой, получаемой для каждого опыта, или по формуле, выведенной из данных определения стандартов, рассчитывается содержание глюкозы в испытуемых образцах крови.

Максимальное развитие окраски через 15—17 мин. имеет место при применении для реактива указанного авторами количества кристаллической пероксидазы из хрена. При применении препаратов глюкозооксидазы той же активности и препаратов пероксидазы из хрена с меньшей активностью окраска развивается медленнее и достигает максимума через 22—25 мин.

Как уже указывалось, для ферментативного определения глюкозы помимо глюкозооксидазы необходимо иметь также препарат пероксидазы. Однако в СССР в настоящее время нет еще производственного получения этого фермента. Получение его из хрена является громоздким, требует специального выращивания хрена и прочее. Поэтому представляло интерес изыскание различных источников пероксидазы и препаратов, обладающих пероксидазной активностью.

Как известно, гемоглобин обладает определенной пероксидазной активностью. В Институте биохимии АН УССР Гулым, Дворниковой и Печеновой был разработан простой метод получения сухих препаратов кристаллического гемоглобина из крови крупного рогатого скота, свиньи и кролика. Была проверена возможность использования этих препаратов в качестве источника пероксидазы для ферментативного определения глюкозы в крови. Проведенные исследования позволили нам [124] рекомендовать сухие препараты кристаллического гемоглобина крупного рогатого скота, обладающие пероксидазной активностью, для ферментативного определения глюкозы в крови. Реактив для определения глюкозы готовится следующим образом: к 90 мл 0,25 М ацетатного буфера pH 4,8 добавляют 2 мг препарата очищенной глюкозооксидазы Q_{O_2} порядка 100 000 и 8 мг сухого препарата кристаллического гемоглобина крупного рогатого скота. Смесь перемешивают, приливают 1 мл 1%-ного спиртового раствора о-толидина и объем доводят до 100 мл ацетатным буфером. Реактив готовится за 1—2 часа до употребления и сохраняется в холодильнике в темных склянках длительное время

(2—3 недели) Максимальное развитие окраски наступает через 20—25 мин. и сохраняется 8—10 мин. Время максимального развития окраски зависит от активности препаратов глюкозооксидазы и пероксидазы.

Глюкозооксидазный метод определения глюкозы в биологических жидкостях необходим для диагностики и контроля эффективности терапии ряда заболеваний, таких, как диабет и злокачественные новообразования.

Лукомская и Городецкий [123] провели определение содержания глюкозы в крови здоровых людей (доноров) и людей, больных сахарным диабетом, глюкозооксидазным методом и одним из химических методов (Хегедорна—Иенсена) Полученные ими данные свидетельствуют о том, что только ферментативный метод определения глюкозы отражает истинное содержание глюкозы в крови, что важно для диагностики и терапии диабета.

Нейфах, Монахов и Кисина [137] применили очищенные препараты глюкозооксидазы для определения гексокиназной активности сыворотки крови больных различными злокачественными новообразованиями. Активность гексокиназы они регистрировали по убыли глюкозы, которую определяли с помощью высокоспецифичной глюкозооксидазы, полученной из *P. vitale*.

Предложенный Нейфахом и Монаховым метод диагностики злокачественных опухолей с помощью гексокиназного теста был испытан Михайловым [138] при таких злокачественных заболеваниях, как лейкоз, лимфогрануломатоз и др. Им установлено, что положительный гексокиназный тест имеет место в 74,3% случаев, причем у детей, больных лейкозом, он оказался положительным в 100% случаев. В группе здоровых детей ни в одном случае не была обнаружена активность гексокиназы.

В настоящее время метод определения активности гексокиназы сыворотки крови с использованием глюкозооксидазы для диагностики злокачественных новообразований находит применение в медицине [139].

Применение глюкозооксидазы в пищевой промышленности

В настоящее время глюкозооксидаза за рубежом нашла применение в пищевой промышленности для удаления глюкозы из ряда продуктов или удаления кисло-

рода из продуктов, в которых его присутствие приводит к порче их, потере аромата, цвета, вкусовых качеств и др.

Глюкозооксидаза оказалась эффективной для удаления кислорода из таких напитков, как фруктовые соки, пиво, яблочное вино, при приготовлении майонеза, при упаковке сухих пищевых продуктов и др. Работы в этом направлении проводились главным образом в Соединенных Штатах [125].

Как сообщил Андеркофлер [42], перед применением глюкозооксидазы в пищевой промышленности были поставлены опыты по определению свойств промышленных препаратов глюкозооксидазы: специфичности, оптимума pH, скорости окисления глюкозы, устойчивости к температуре, скорости потребления O_2 в условиях, близких к практике и применительно к отдельным продуктам.

Эти исследования позволили внести некоторые поправки в данные по действию фермента, полученные другими исследователями при определении его активности в идеальных условиях лабораторного опыта (при наличии непосредственного контакта кислорода, фермента и субстрата).

Удаление глюкозы с помощью глюкозооксидазы, по данным Фойта [126], применяется при высушивании яиц, являющихся продуктом со значительным содержанием глюкозы. В яичном белке содержится около 3% глюкозы на сухое вещество, а в желтке — около 0,5%.

Обработка яиц глюкозооксидазой предотвращает нежелательное окрашивание в период длительного хранения, которое могло появиться как результат реакции между глюкозой и аминокруппами белка.

Удаление глюкозы из яичного альбумина или цельных яиц перед высушиванием, по данным Болдуина и сотрудников [127], предотвращает образование вторичных веществ с неприятным привкусом, которые могут появляться в присутствии глюкозы. Для этой цели глюкозооксидазу применяют по следующей прописи: 50 г глюкозооксидазы марки DeeO на 453,6 кг яичного альбумина или 150 г на 453,6 кг цельных яиц или желтка при температуре 32° С; кислород подается в виде 35%-ной перекиси водорода, добавляемой по частям.

Как сообщает Андеркофлер [42], в последнее время в условиях повышенной температуры (40° С) и вдвое мень-

шем количестве фермента при обработке цельных яиц для полного удаления сахара требуется более продолжительное время воздействия (еще один час).

Глюкозооксидаза все шире находит применение при приготовлении майонезов. Известно, что майонезы, приготовленные из высококачественного сырья, подвергаются постепенной порче и через 3—4 месяца хранения практически непригодны к употреблению. Добавленная к майонезу глюкозооксидаза, из расчета 50 мг% в период приготовления, по данным Блума и сотрудников [128], предохраняет от порчи в течение 6 месяцев, в то время как контрольные образцы майонеза без глюкозооксидазы испортились и прогоркли через 3 месяца.

Андеркофлер [42] сообщил, что майонез, приготовленный с 20—25 мг% глюкозооксидазы марки DeeO, хорошо сохранялся в лабораторных условиях в течение 6 месяцев и даже больше года, контрольные же пробы оказались полностью непригодными для употребления.

Глюкозооксидаза нашла применение при стабилизации пива. Как сообщил Олнмейер [129], непастеризованное пиво при комнатной температуре уже на 7—12-й день теряет свои первоначальные качества в результате роста дрожжевых клеток и ряда других микроорганизмов (дикие дрожжи, бактерии). Это приводит к помутнению пива и выпадению хлопьев, в то время как добавление 0,5 г ферментного препарата на 120 л непастеризованного пива обеспечивает длительное хранение его. Наблюдения, проведенные в течение 50 дней, показали, что пиво хорошо сохраняется. Его внешний вид и вкусовые качества не изменились:

Длительность хранения (дни)	0	28	35	43	50	Количество дрожжевых клеток, млн.
Непастеризованное пиво + фермент	0	4	15	18	30	
Непастеризованное пиво без фермента	.37	3200	9200	20 000	Молочная муть	

Автор обращает внимание на то, что в исследуемом пиве имеется немного глюкозы.

Как сообщил Андеркофлер [42], сравнительные исследования по определению количества кислорода в газовом пространстве бутылок пива, содержащих 5 мг% DeeO-глюкозооксидазы и 25 мг% метабисульфита, по-

казали, что глюкозооксидаза уменьшала содержание кислорода за неделю до того же самого уровня, какой с бисульфитом достигался через 2,5 месяца. Однако удаление кислорода глюкозооксидазой было неполным, видимо, из-за недостатка глюкозы.

Возможность удаления кислорода из пива с помощью глюкозооксидазы ставит под сомнение мнение ряда авторов о том, что пиво не содержит глюкозы.

Для сухих обезвоженных продуктов (жиры, сухое молоко и др.) очень эффективным оказался метод, основанный на использовании специально приготовленных пакетов. Материалом для приготовления пакетов могут служить полиэтиленовые пленки, непроницаемые для воды, но проницаемые для кислорода. Пакеты, содержащие фермент, глюкозу, буфер, наполнитель и жидкость, помещаются в тару, содержащую пищевой продукт и герметически запечатываются. Содержимое пакета быстро поглощает кислород и тем самым предохраняет продукты от окисления.

Заслуживает внимания сообщение Куртца и Ионезавы [130] о том, что такие пакеты удаляли кислород из сухого цельного молока в течение 24 часов при температуре 21 или 38° С.

Андеркофлер [42] сообщил, что сдобные кондитерские изделия, запечатанные в консервные банки с пакетами, содержащими реактивную смесь, при хранении в течение месяца при 38° С и в течение 5 месяцев при температуре около 22° С при вскрытии банок показали незначительные изменения цвета продукта без наличия прогоркания, в то время как содержимое банок, в которых не было таких пакетов, стало коричневого цвета и полностью прогоркло.

По его мнению, пакеты с глюкозооксидазой могут найти применение не только в пищевой промышленности, их можно использовать для предохранения тонких деталей машин и приборов от ржавчины и коррозии.

Бартон, Реннерт и Андеркофлер [125] сообщили о защитном действии глюкозооксидазы против коррозии консервных банок с напитками, насыщенными углекислотой. Глюкозооксидаза марки DeeO добавлялась из расчета от 10 до 30 мг %.

Глюкозооксидаза находит применение при упаковке таких продуктов, как сыр, мясо, кофе. Если сыр по-

крыть специально приготовленной пленкой, содержащей глюкозооксидазу, то можно избежать темного окрашивания верхних слоев сыра, которое наступает при обычной упаковке. Упаковка мяса в фольгу, пропитанную реакционной смесью, содержащей глюкозооксидазу, способствует длительному сохранению естественного цвета [131].

В своем обзоре «Получение, свойства и применение глюкозооксидазы» Фойт [126] приводит данные ряда исследователей по положительному влиянию препаратов глюкозооксидазы на сохранение фруктовых соков, яблочного вина, пива и других продуктов.

В Советском Союзе препараты глюкозооксидазы также начинают испытываться в пищевой промышленности.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ МИКРОЦИДА НА ЕГО АНТИБИОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

В. Е. Заневич [132] проверила свыше 700 серий микроцида и установила, что разные производственные серии микроцида довольно стойко сохраняют свою антибиотическую активность в течение длительного времени [3 года] при хранении в герметически укупоренных бутылках при температуре $+28$, $+30^{\circ}$ С.

При хранении микроцида в бутылках, закрытых ватными пробками, при $+20^{\circ}$ С он сохраняет первоначальную активность в течение 8 дней, затем антибиотическая активность быстро снижается. С повышением температуры до $37-40^{\circ}$ С хранение его в бутылках с ватными пробками допустимо не более 24 час. Замораживание жидкого микроцида до -30° не снижает титра.

Густые концентрированные препараты микроцида, обладая большей антибиотической активностью, более устойчивы к хранению. Они не теряют своей активности при длительном хранении даже в условиях негерметической укупорки [133].

Е. А. Никольская в 1961 г., проверяя активность нескольких серий микроцида по отношению к *Staph. aureus* 209, после длительного хранения препарата (табл. 31) установила, что даже десятилетний срок не приводит к полной инактивации препарата, хранившегося в герметически укупоренных бутылках.

Антибиотическая активность микроцида по отношению к *Staph. aureus* 209 после различного срока хранения

Микроцид и его характеристика	Срок хранения препарата	рН	Разведения микроцида								Характер действия	Контроль культуры	Контроль среды	Контроль микроцида
			1:10	1:100	1:1000	1:4000	1:8000	1:10000	1:16000	1:20000	1:24000	1:32000		
Серия № от 20.XII 1950 г. Титр 1:20000, рН 3,36	10 лет 4 мес.	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
			—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
Серия № 19 от 24.I 1951 г. Титр 1:64000, рН 3,45	10 лет 3 мес.	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
			—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
Серия № 134 от 13.II 1952 г. Титр 1:40000, рН 3,5	9 лет 2 мес.	3,4	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
			—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
Серия № 124, контрольный титр в 1953 г. 1:10000	8 лет	3,4	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
			—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
Микроцид от 15.IV 1961 г., рН 3,36	Свежеприготовл.	3,36	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

У словные обозначения: — отсутствие роста; + — рост *Staph. aureus* 209; БС—бактериостатическое действие; БЦ—бактерицидное действие.

1. Максимов М. А., Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft, **22**, 1904, 225.
2. Müller D. Biochem. Z., **199**, 1928, 136.
3. Müller D. Biochem. Z., **232**, 1931, 423.
4. Müller D., Enzymologia, **10**, 1941, 40.
5. Franke W., Lorenz F., Liebig's Ann., **532**, 1937, 1.
6. Franke W., Deffner M., Liebig's Ann., **541**, 1939, 117
7. Harrison D. C., Biochem. J., **25**, 1931, 1016.
8. Ogura J., Acta Phytochim. Japon., **11**, 1937, 127 (цит. по Walker T. H., Adv. of Enzymol., **9**, 1949, 560).
9. Coulthard C. E., Short W. E., Michaelis R. a. oth., Nature, **150**, 1942, 634.
10. Coulthard C. E., Short W. E. Michaelis R. a. oth., Biochem. J., **39**, № 1, 1945, 24.
11. Warburg O. und Christian W. Biochem. Z., **266**, 1933, 377.
12. Broom W. A., Coulthard C. E. Brit. J. Pharmacol., **1**, 1946, 225.
13. Kocholaty W., Science, **97**, 1943, 186.
14. Kocholaty W., Arch. Biochem., **2**, 1943, 73.
15. Roberts E. C., Cain C. K., Muir R. D., Reithel F. G., Gary W. L., van Bruggen J. T., Hamon, Katzman A., Coher, Dassy A., J. Biol. Chem., **147**, 1943, 47.
16. Van Bruggen J. T., Reithel F. G., Cain C. K., Philip R., Katzman A., Doisy A., Muir, Roberts E. C. a. oth., J. Biol. Chem., **148**, 1943, 365.
17. Birkinshaw G. H. and Reistrick H., J. Biol. Chem., **148**, 1943, 459.
18. Keilin D. and Hartree E. F. Nature, **157**, № 3998, 1946, 801.
19. Keilin D. and Hartree E. F. Biochem. J. **42**, № 2, 1948, 221.
20. Keilin D. and Hartree E. F., J. Biol. Chem., **50**, 1952, 331.
21. Bentley R. and Neuberger A., Biochem. J., **45**, 1949, 584.
22. Kusai K., Sekuzu I., Hagihara R., Okunuki K., Jamachi S. Nakai M., Biochem. et Biophys. acta, **40**, № 3, 1960, 555.
23. Kusai K., Annual report of scientific works, Faculty of science Osaka University, **8**, 1960, 43.
24. Билай В. И., Пидопличко Н. М., Антибиотик микроцид, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1953, 44.

25. Пидопличко Н. М., Билай В. И. Антибиотик микроцид, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1953, 32.
26. Билай В. И., Микроскопические грибы — продуценты антибиотиков, Изд-во АН УССР, К., 1961.
27. Беккер З. Е., Физиология грибов и их практическое использование, Изд-во Московского университета, 1963.
28. Пидопличко Н. М. и Билай В. И., Антибиотик микроцид, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1953, 5.
29. Костычев С. П., Получение лимонной кислоты биохимическим путем, «Тр. Центр. н.-и. биохим. ин-та пищев. вкусов. промышл.», т. II, вып. 3, 1932, 70.
30. Буткевич В. С., Растительные кислоты как продукт превращения углеводов грибами, «Микробиология», VIII, 1939, 286.
31. Прянишников Д. Н. Азот в жизни растений и земледелии, Изд-во АН СССР, М., 1945.
32. Нікольська О. О., Закордонець Л. А., Лебедева Т. С., Артемчук Н., «Мікробіологічний журнал», XXV, вип. 5, 1963.
33. Нікольська О. О., «Мікробіологічний журнал», XXIV, вип. 2, 1962, 55.
34. Покровская Н. В., Новикова Л. М., Финогенова Т. В., «Микробиология», XXXI, вып. 5, 1962, 788.
35. Пидопличко Н. М., Билай В. И., Лечебный препарат микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1950, 32.
36. Билай В. И., Пидопличко Н. М., Микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1955, 5.
37. Сорени Э. Т. (см. 83).
38. Гулый М. Ф., Дегтярь Р. Г. Антибиотик микроцид, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1953, 72.
39. Гулый М. Ф., Дегтярь Р. Г., Сб. докладов на Всесоюзной конф. «Внедрение ферментных препаратов в нар. хоз.», ч. I, М., 1961, 158.
40. Гулый М. Ф., Дегтярь Р. Г. ДАН СССР, 145, № 1, 1962, 209.
41. Гулый М. Ф., Дегтярь Р. Г. «Укр. біохім. журн.», XXXIV, № 1, 1962, 137.
42. Андеркофлер Л. А., Производство и применение ферментов в пищевой промышленности, ИЛ. Пищепромиздат, М. 1963, 73.
43. Справочник «Sigma chemical company», 1961, 61.
44. Классификация и номенклатура ферментов, ИЛ, М., 1962, 14.
45. Cori O. and Liptmann F. J. Biol. Chem., 194, № 1, 1952, 414.
46. Bernchauer X., Happe-Seyl, Zeitschr. Physiol. Chem., 177, 1928, 66.
47. Диденко Г. Г., Антибиотик микроцид, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1953, 109.
48. Shales O., Arch. Biochem., 2, 1943, 487
49. Диденко Г. Г., Антибиотик микроцид, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1953, 117
50. Диденко Г. Г., Антибиотик микроцид, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1953, 125.

51. Isabel H. E. Bur. Stand. Journ. Res. 8, 3, 327, 1932; 8, 5, 1932, 615.
52. Гулый М. Ф., Шур-Шульц В. И., Дегтярь Р. Г. Антибиотик микроцид, Сб. ст., Изд-во АН УССР, 1953, 131.
53. Rubin V. A., Garman W., Jole Journ. Biol. a. Med., 19, № 5, 1955, 1077.
54. Монохов Н. К., Нейфах С. А., «Биохимия», 27, вып. 3, 1962, 495.
55. Середа А. Г. «Укр. біохім. журн.», XXXV, № 5, 1963.
56. Гулый М. Ф., Дворникова П. Д., Попадюк Е. Я., «Укр. біохім. журн.», XXIX, 1957, 152.
57. Гулый М. Ф., Дворникова П. Д., Печонова Т. Н., Федорченко Е. Я. «Укр. біохім. журн.», XXXIV, 1962, 187.
58. Гулый М. Ф., Дворникова П. Д., Печонова Т. Н., Мартыненко Ф. П., «Укр. біохім. журн.», XXXIV, 1962, 327.
59. Malmstadt H. V. Hadjoannou S. I., Analyt. Chem., 34, № 4, 1962, 452.
60. Шур-Шульц В. Н., Марусенко Т. А., Лечебный препарат микроцид и его применение, Сб. ст. Изд-во АН УССР, К., 1950, 12.
61. Шур-Шульц В. Н., Марусенко Т. А., Лечебный препарат микроцид и его применение, Сб. ст. Изд-во АН УССР, К., 1950, 82.
62. Дудко Н. Е., Дзбановский В. П., Лечебный препарат микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1950, 17.
63. Протопопов С. И., Лечебный препарат микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1956, 36.
64. Коган Л. М., Лечебный препарат микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1950, 17.
65. Степанюк Т. И., Микроцид и его применение, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1955, 82.
66. Степанюк Т. И., Микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1955, 28.
67. Шляховая В. А., Микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1955, 92.
68. Шляховая В. А., Микроцид и его применение, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1955, 100.
69. Griffith Z. J., Ostrander W. E., Antibiot. and Chemotherapy, 9, № 7, 1959, 416.
70. Зельманович В. М., Докучаева М. И., «Антибиотики», 5, № 5, 1960.
71. Moncrief J. A., Rivera J. A., Ann. Surg., 147, № 3, 1958, 295.
72. Визирь П. Е., Лечебный препарат микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1950, 86.
73. Сахновская Т. К., Микроцид и его применение, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1955, 88.
74. Мандрик Т. Г. Антибиотики, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1958, 119.
75. Мандрик Т. П., Антибиотики, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1958, 127.
76. Мандрик Т. П., Антибиотики, Сб. ., Изд-во АН УССР, К., 1958, 113.

77. Бельтюкова К. И., Микроцид и его применение, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1955, 116.
78. Бельтюкова К. И., Лечебный препарат микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1950, 116.
79. Билай В. И., Пидопличко Н. М., Тезисы докладов Первого всесоюзного биохимического съезда, вып. 3, Изд-во АН СССР, М.—Л., 1963, 7.
80. Дегтярь Р. Г., Гулый М. Ф., Тезисы докладов Первого всесоюзного биохимического съезда, вып. 1, Изд-во АН СССР, М.—Л., 1963, 100.
81. Дзбановский В. Н., Микроцид и его применение, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1955, 23.
82. Вайсблат С. Н., Микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1955, 60.
83. Дегтярь Р. Г., Влияние очищенных препаратов микроцида на обмен веществ здорового животного организма, Диссертация, К., 1952.
84. Дегтярь Р. Г., Антибиотик микроцид, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1953, 78.
85. Дегтярь Р. Г., Антибиотик микроцид, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1953, 95.
86. Дегтярь Р. Г., Антибиотик микроцид, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1953, 100.
87. Дзбановский В. Н., Микроцид и его применение, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1955, 13.
88. Чаругин А. И., Микроцид и его применение, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1955, 42.
89. Вайсблат С. Н., Бух-Чечик С. Н., Микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1955, 50.
90. Новик И. О., Микроцид и его применение, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1955, 67.
91. Яворская Е. С., Микроцид и его применение, Сб. Изд-во АН УССР, К., 1955, 74.
92. Иващенко Д. А., Лечебный препарат микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1950, 63.
93. Харланов Ф. П., Лечебный препарат микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1950, 69.
94. Колибаба А. П., Микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1955, 78.
95. Keston A. S., Abstracts of papers Americ. Chemic. Society, 129 Meeting, Dabbes, Texas, p. 31, C, Journ. The Franklin Inst., 265, № 5, 1958, 417.
96. Sohlubach H. H., Seepennig K., Angev. Chem., 71, № 5, 1959, 193.
97. Raab E., Terklasén T. C., Scand. J. Clin. and Lab. Invest, 12, № 4, 1960, 402.
98. Kramer-Jakobson Z. Scand. J. Clin. and Lab. Invest., 12, № 1, 1960, 76.
- Kingsley G. R., Getchele G. Clin. Chem. 6, № 5, 1960, 466.
- Kreutzer H. H., Bosman M. Nederl. tijdscher. geneskand, 104, № 29, 1960, 1379 (цит. по р. ж. «Биологическая химия», 1961, 9, C42).
- Wasdcko M. E., Rice E. W. Clin. Chem., 7, № 5, 1961, 542.

102. Goll K. H. Döpkew, Z. ges. innere Med., 16, № 24, 1961, 1062.
103. Köhler P., Z. ges. innere Med., 17, № 15, 1962, 674 (цит. по р. ж. «Биологическая химия», 1963, 3, Ф39).
104. Feinsmith B. M., Clin. Chim. acta, 7, № 1, 1962, 58.
105. McComb R. B. and Justok W. D. J. Franklin Inst., 265, № 5, 1958, 417
106. Borthelmai W., Czok R., Klin. Wochenschr., 40, № 11, 1962, 585.
107. Jakobson Z. Scand. J. Clin. and Lab. Invest. 13, № 3, 1961, 374.
108. Cynthia W Vincent M., J. Clin. Pathol., 14, № 5, 1961, 558.
109. Blaedel W G. Hicks G. P Analyt. Chem. 34, № 3, 1962, 388.
110. Hill G. B., Kessler G., Hill C. H. Chauncey N. J. J. Lab. and Clin. Med., 57, № 6, 1961, 970.
111. Malmstadt H. V and Hicks P Analyt. Chem. 32, № 33, 1960, 394.
112. Malmstadt H. V Pardue H. L. Analyt. Chem., 33, № 8, 1961, 1040.
113. Lipscomb H., Bean J. Dobson H. Greemjomer A., Diabetes, 7, № 6, 1958, 486.
114. Miller D. I., Ridolfo A. S., Diabetes, 9, № 1, 1960, 48.
115. Borem E. S., Levis J. C. Analyt. Biochem., 3, № 3, 1962, 230.
116. Salton M. R., J., Nature, 186, № 4729, 1960, 966.
117. Frank H., Kirberger E., Biochem. Z., 320, 1950, 359.
118. Scott D., Hammer F. E., Analyt. Biochem., 3, № 1, 1962, 13.
119. Wite J. W Subers M. H., Analyt. Biochem. 2, № 4, 1961, 380.
120. Dahlgvist A., Biochem. J., 80, № 3, 1961, 547.
121. Williams K. T., Patter E. F., J. Assoc. Offic. Agric. Chemists, 44, № 2, 1961, 267 (цит. по р. ж. «Биологическая химия», 1962, 19, C127).
122. Лукомская И. С., Городецкий В. К., «Вопросы мед. химии», VI, № 6, 1960, 641.
123. Лукомская И. С., Городецкий В. К., Биохимия, 26, вып. 3, 1961, 477.
124. Гулый М. Ф. Дегтярь Р. Г., Применение кристаллического гемоглобина крупного рогатого скота для ферментативного определения глюкозы в биологических жидкостях (в печати).
125. Barton R. R., Renert S. S., Underkopler L. A., Food Engug., 27(12), 1955, 79.
126. Voigt J., Ernährungsforschung, VI, H. 5, 1961, 563.
127. Baldwin R. R., Campbell H. A., Thiessen R. Lorant G. G., Food Tech., 7, 1953, 275.
128. Bloodn J., Scopiield G. and Scott D. Food Packer, 37 (13), 1956, 16.
129. Ohlmeyer D. W., Food Technol., 11, 1957, 503.
130. Kurtz C. W. a. Jonesowa J., Inst. Fd. Technologists, 17-th Annual Mtg. (Pittsburg), Food Techn., 11 (4), Abstr., 1957, 16.
131. Scott D., Food Technol., 12, Sonderteil H. 7, 1958, 7
132. Заневич В. Е., Микроцид и его применение, Сб. ст., Изд-во АН УССР, К., 1955, 145.

133. Дастров А. М., Заневич В. Е., Микроцид его применение, Изд-во АН УССР, К., 1955, 145.
134. Федоров М. В., Жизнь и научная деятельность проф. В. С. Буткевича, Изв. АН СССР, Ср. Биол., № 5, 1945, 501.
135. Фостер Д., Химическая деятельность грибов, ИЛ, М., 1950.
136. Покровская Н. В., Воробьева М. Т., «Тр. н.-и. института пивоваренной, безалкогольной и винной промышленности», вып. 9, 1962, 62.
137. Нейфах С. А., Монахов Н. К., Кисина Ж. М. Вопросы онкологии, 9, № 5, 1963, 68.
138. Михайлов В. В., Тезисы докладов Первого Всесоюзного биохимического съезда, вып. 2, Изд-во АН СССР, М.—Л. 1963, 258.
139. Гоникман Э. И., Тезисы докладов Первого Всесоюзного биохимического съезда, вып. 2, Изд-во АН СССР, М.—Л. 1963, 240.
140. Munk V., Páskova J. and Hanus J. Folia Microbiologica, vol. VIII, 4, 1963, 203.
141. Ганус Я., Мунк В., Тезисы докладов на V международном биохимическом конгрессе, т. I, 5, 42, 1961, 245.
142. Пейве Я. В., Микроэлементы и ферменты, Изд-во АН Латв. ССР, Рига, 1960.
143. Sopp O. Johan-Olsen, Mat.-Naturv. Klasse, № 11, 1912, 1—208.
144. Kalijanasundaram R. and Saraswathi-Devi L. Atk. Nature, 175, № 4465, 1955, 945.
145. Waksman S. A. and Foster J. W. C. R. Acad. Sci., Paris, CCVII, 1938, 483—486.
146. Lilian E., Hawker, Physiology of fungi, 1950, 68.
147. Bertrand G. and Javillier M., C. R. Acad. Sci., Paris, CLII, 1911, 225—228.
148. Bortels H., Biochem. Z., CLXXXII, 1927, 301—358.
149. Steinberg R. A. J. Agric. Res., LII, 1936, 439—440.
150. Steinberg R. A., Ibid., LV, 1937, 891—901.
151. Steinberg R. A., Ibid., LVII, 1938, 569—574.
152. Steinberg R. A., Ibid., LIX, 1939, 731—748.
153. Имшенецкий А. А., Отбор активных рас *Penicillium*, Изд-во АН СССР, 1951.
154. Имшенецкий А. А., Микробиология, 22, 1953, 133—140.
155. Двадцатова Е. А., Сб. «Внедрение ферментов в народное хозяйство», Л., 1961.
156. Татаренко Е. С., Герасимова И. П., Высоцкая М. А., Терникова Н. П., Сб. «Внедрение ферментных препаратов в народное хозяйство», Л., 1961.
157. Брокская С. З., Сб. «Внедрение ферментных препаратов в народное хозяйство», Л., 1961.
158. Логинова Л. Г., Микробиология, 29, вып. 5 и 6, 1960.
159. Никольська О. О., Дегтяр Р. Г. «Мікробіол. журн.», XXVI, вип. 1, 1964, 48.
160. Никольская Е. А., Лебедева Т. С., Тезисы докладов Первого всесоюзного биохимического съезда, вып. 2, Изд-во АН СССР, М.—Л., 1963, 181.

Coloniis in agarō Czapekii moderate crescentibus, initio albis, dein viride-coeruleis, denique sordido-griseis, velutinis vel tenuiter pubescentibus; guttulis numerosis, pallide-flavis; reverso initio stramineo-flavo, dein flavo-brunneo; agarō virescente. Conidiophoris vulgō 250—300=2—3,5 μ , levibus, monovel biverticillatis, interdum sursum uno ramulo monoverticillato ornatis. Ramulis plerumque 10—15=2—3 μ , metulis 8—10=2—3 μ , vix divaricatis, vulgō trinis—quaternis, sterigmatibus flagellatis, 6—8=2—2,5—(3) μ plerumque binis-quinis. Conidiis, initio ellipsoideis, saepe ovalibus, dein late-ellipsoideis, globoso-ovalibus, plus-minusve globosis, 2,5—3=2—2,5 μ , interdum usque ad 4 μ in diam., catenulatis, levibus, in copiosis viridibus, catenulis divergentibus vel implicatis.

Coloniis in musto cerevisiae agarisato celeriter crescentibus, initio albis, dein viridae — coeruleis, velutinis vel pubescentibus, moderate densis, undulatis, denique viride-sordido-griseis; guttulis pallide-flavis, numerosis, reverso stramineoflavo, dein flavo-brunneo; agarō virescente.

In solo, Ucraina australis.

A *Penicillio chrysogeno* et *P. notato* diversum.

Методы получения глюкозооксидазы

Анти-биотик	Продуцент	Литературный источник	Этапы выделения фермента из культуральной жидкости	Характеристика очищенного препарата		
				Титр	QO ₂	Специфичность
Ногатин	<i>Penicillium notatum</i>	Coulthard C. E., Short N. E., Michaelis R. и др., Nature, 150, 1942, 634.	Упаривание культуральной жидкости с титром 1:30 000 — 1:70 000 в вакууме при 25° С до 1/5 объема.	300—400·10 ⁻⁶		
			Осаждение фермента при 0° С двойным объемом ацетона в течение ночи. Отделение осадка на центрифуге. Растворение осадка в воде. Осаждение фермента из раствора равным объемом ацетона при 0° С. Растворение осадка в воде. Осаждение фермента равным объемом ацетона при 0° С. Растворение осадка фермента в воде. Дальнейшая очистка. Раствор разводится до 700 мл и к нему прибавляется 8 г танина при 0° С. Отделение осадка на суперцентрифуге. Обработка осадка 2—3 порциями по 50 мл ацетона с последую-			
		Coulthard C. E., Short N. E., Michaelis R. и др., Biochem. J., 39, 1945, 24.				

Анти- биотик	Продуцент	Литературный источник	Этапы выделения фермента из культураль- ной жидкости	Характеристика очищенного препарата		
				Титр	Q_{O_2}	Специфичность
			шим центрифугированием. Извлечение фермента из осадка 2—3 порциями воды. Осаждение равным объемом ацетона. Отделение осадка на центрифуге, промывка ацетоном и высушивание в вакууме над $CaCl_2$. Выход 20—40% исходного. Дополнительная очистка. Высаливание фермента из раствора сульфатом аммония при доведении его концентрации до 50—83% насыщения. Диализ 56 час. Осаждение фермента ацетоном и высушивание.	3—4·10 ⁻⁸	48000—120000	Содержит каталазу
Пена- тин	<i>Penicil- ium notatum</i>	Kochaloty N., Science, 97, 1943, 186.	I Осаждение фермента фосфорно-вольфрамовой или фосформольбденовой кислотой при 0° С. II Адсорбция на каолине (специальной обработки) в количестве			

Пенициллин В	<i>Penicillium notatum</i>	8 г каолина, разведенного до 200 мг/мл H_2O, при pH 4,0 и перемешивании в течение ночи. Промывка каолина дистиллированной водой в течение ночи. Элюция фермента $1/20$ объема: 1) раствора $M/5 Na_2HPO_4$ при pH 6,3 в течение ночи (выход 10—100%) или 2) $M/5 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4$ при pH 6,3 в течение ночи или 3) пиридином. Осаждение фермента диоксаном при его концентрации 60—70% (2 объема) в течение ночи. Отделение осадка на центрифуге и растворение в воде. Диализ раствора. Высушивание методом лиофилизации.	Очищен в 1000 раз	
Пенициллин В	Roberts E. C., Cain C. K., Muir R. D., Reithel F. Y. и др., J. Biol. Chem., 147, 1943, 47	I Осаждение фермента бензойной кислотой. Отделение осадка на центрифуге. Осаждение раствора фермента 0,5 объема ацетона. Отделение балластного осадка на центрифуге. Прибавление к центрифугату еще 0,5 объема ацетона. Отделение осадка на центрифуге и высушивание.		

Анти- биотик	Продуцент	Литературный источник	Этапы выделения фермента из культуральной жидкости	Характеристика очищенного препарата		
				Титр	QO_2	Специфичность
		II				
		Van Bruggen G. T., Reithel F. G., Cain C. K. и др., J. Biol. Chem., 148, 1943, 365.	Осаждение фермента из культуральной жидкости уранилацетатом (15—20 мл 1%-ного раствора на 1 л жидкости, pH 3,5—3,9). Отделение осадка на центрифуге и промывка 1—2 раза водой. Экстракция фермента из осадка 0,2M фосфатным буфером pH 6,8 (несколько часов). Отделение осадка на центрифуге и повторная экстракция фермента. Осаждение фермента из объединенного экстракта тройным объемом насыщенного раствора $(NH_4)_2SO_4$. Отделение осадка на центрифуге и растворение в воде. Диализ против дистиллированной воды. Высушивание методом лиофилизации.			1:6 миллионов
						Электрофретически и не гомогенен

Микрогрид	<i>Penicillium vitale</i>	Сорени Э. Т. (неопубликованные данные), 1950	I Осаждение фермента из культуральной жидкости сульфатом аммония при доведении его концентрации до 85% насыщения в течение 2—3 дней. После декантирования надосадочной жидкости сбор осадка при центрифугировании. Растворение осадка в воде. Подкисление раствора фермента с помощью уксусной кислоты до pH 4. Прогревание подкисленного раствора 5 мин. при 56°С и отделение раствора от балластного осадка на центрифуге. Осаждение фермента из центрифугата двойным объемом ацетона при 0°С (ацетон — 10°С). Отделение осадка на центрифуге и растворение в воде. Повторное переосаждение ацетоном. Растворение осадка в воде и осаждение ацетоном (третий раз). Высушивание полученного осадка в вакууме над серной кислотой.	10^{-10} 200 000
Микрогрид	<i>Penicillium</i>	Гулый М. Ф., Дегтярь Р. Г.,	II Адсорбция фермента из культуральной жидкости при pH 7,0	

Анти- биотик	Продуцент	Литературный источник	Этапы выделения фермента из культуральной жидкости	Характеристика очищенного препарата		
				Титр	Q_{O_2}	Специфичность
<i>vitale</i>		сб. «Антибиотик микроид», Изд-во АН УССР, К., 1953, 72; ДАН СССР, 145, № 1, 1962, 209	на безводную окись алюминия (1—2 часа). Элюция фермента аммонийфос- фатным буфером при встряхива- нии (9% H_4C на 0,3 М KH_2PO_4) 20—30 мин. Отделение элюата с помощью во- ронки Бюхнера. Повторная элюция тем же раство- ром, введенным в два раза во- дой. Осаждение фермента из объединен- ного элюата двойным объемом этилового спирта при 0° С (спирт — 10° С). Отделение осадка на центрифуге при 4000—5000 об/мин. Растворение осадка в ледяной во- де и отделение раствора центри- фугированием. Двукратное осаждение фермента из раствора ацетоном при 0° С (ацетон — 10° С) и последую- щим отделением осадка центри- фугированием. Растворение осадка в воде и высу- шивание методом лиофилизации.	$4 \cdot 10^{-7}$ $8 \cdot 10^{-7}$	150 000 250 000	Строго спе- цифичен по отношению к β -D-глюко- зе. Не со- держит ка- талазы

					186 000	Фермент гомогенен в ультра- центрифуге
		Гулый М. Ф., Дегтярь Р. Г., ДАН СССР, 145, № 1, 1962, 209; «Укр. биохим. журн.», XXXIV, № 1, 1962, 37	Получение глюкозооксидазы в кристаллическом виде	Насыщение водного раствора очи- щенной глюкозооксидазы серно- кислым аммонием до 52—55% насыщения (появления первой стойкой муты). Через несколько часов выпадают кристаллы глю- козооксидазы. Двукратная пере- кристаллизация: растворение в воде осадка кристаллов, отде- ленных с помощью центрифуги- рования, и прибавление к нему сернокислого аммония до появ- ления первой стойкой муты.		
Глю- козо- окси- даза	<i>Penicil- lium amogasa- kiense</i>	Kusai K., Se- kuzu и др., Biochem. et Biophys. acta, 40, 1960, 555. Kusai K., Annual Report of Sci- entific Works, 48, 1960, 43.	Адсорбция фермента из культу- ральной жидкости при pH 4— 4,5 на колонке со смолой А (ам- берлит Г-50). Промывка колонки 0,1M аммоний- ацетатным буфером. Элюция фермента 0,1M аммоний- ацетатным буфером pH 6,5 на холоду при встряхивании 30 мин. Фильтрование элюата через стек- лянный фильтр. Промывка ко- лонки тем же буфером. Диализ объединенного раствора (элюата и промывочной жидкости) против 0,1M аммонийацетатного			

Анти-биотик	Продуцент	Литературный источник	Характеристика описанного препарата			
			Этапы выделения фермента из культуральной жидкости	Титр	QO ₂	Специфичность
			буфера при pH 4,5 и 5°С — 24 часа. Отделение выпавшего осадка на центрифуге. Адсорбция фермента из раствора (центрифугата) на смолу А (вторая колонка). Элюция аммонийацетатным буфером pH 4,5, а затем pH 5. Насыщение элюата (pH 5) сернокислым аммонием до 60% насыщения. Отделение выпавшего балластного белка на центрифуге. Насыщение центрифугата сернокислым аммонием до 80% насыщения. Отделение осадка фермента на центрифуге. Растворение осадка в 0,05N ацетатном буфере pH 5 и диализ против этого же буфера 48 час. Адсорбция фермента из диализованного раствора на колонку со смолой В. Элюция 0,05N аммонийацетатным буфером pH 5 (отбираются главные фракции).			

	<i>P. vitale</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. sp.</i>	Покровская Н. В., Воробьева М. Т., «Гр. н.-и ин-та пивоваренной, безалкогольной и винной промышленности», ГХ, 1962	Насыщение раствора сернистым аммонием до 70%. Осадок отбрасывается. Насыщение раствора сернистым аммонием до 80%. Получение кристаллов Растворение осадка, выпавшего при 70—80% насыщения сернистым аммонием, в воде. Насыщение раствора сернистым аммонием до появления первой мути. Через 1—2 дня появляются кристаллы. Перекристаллизация.	148 364	Препарат гомогенен в ультра- центрифуге
			Осаждение фермента из культуральной жидкости, содержащей мел, четырехкратным объемом охлажденного спирта или ацетона. Экстракция фермента из осадка пятикратным объемом воды. Диализ экстракта 50 час. Осаждение фермента из раствора ацетоном. Высушивание из замороженного состояния.	10 000	Содержит каталазу*
Глюкозооксидаза	<i>Aspergillus niger</i>		Мицелий измельчается в шаровой мельнице десятикратным объемом воды.		Жидкость отделяется фильтрованием.

Анти-биотик	Продуцент	Литературный источник	Этапы выделения фермента из культуральной жидкости	Характеристика очищенного препарата		
				Титр	Q_{O_2}	Специфичность
		Г а н у с Я., М у н к В. Л., Тезисы докладов на V междунар. биохим. конгрессе, т. I, 5,42, 1961, 245	Фермент осаждается из раствора полуторакратным объемом этилового спирта. Осадок отфильтровывается через пористый фильтр и высушивается на воздухе.			
			Дальнейшая очистка Диализ против 0,005M Na_2HPO_4 рН 8,4 — в течение ночи. Хроматография на колонке ДЕАЕ. Повторная хроматография на колонке ДЕАЕ. Есть фракция, которая не содержит каталазы. Диализ.		618 в 1 г 1030 ед. Сорето	15 ед. каталазы

* Авторы не указывают на наличие в их препаратах каталазы. Наличие каталазы мы установили при анализе одного из лучших образцов этого препарата.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Грибная глюкозооксидаза, ее природа и свойства	4
Характеристика гриба <i>Penicillium vitale</i> — продуцента глюкозо-оксидазы	18
Распространение глюкозооксидаз у разных видов рода <i>Penicillium</i> Lk.	24
Физиологические основы биосинтеза глюкозооксидазы грибом <i>Penicillium vitale</i>	28
Влияние некоторых макро- и микроэлементов на антибиотическую и ферментативную активность <i>Penicillium vitale</i> .	45
Выделение, очистка и характеристика глюкозооксидазы из <i>Penicillium vitale</i>	50
Метод получения сухих очищенных и кристаллических препаратов глюкозооксидазы	52
Получение кристаллических препаратов глюкозооксидазы.	56
Методы определения активности глюкозооксидазы.	58
Свойства глюкозооксидазы из <i>Penicillium vitale</i>	65
Свойства глюкозооксидазы в культуральной жидкости (микроцида)	—
Свойства кристаллических препаратов глюкозооксидазы.	77
Антибактериальные свойства глюкозооксидазы из <i>Penicillium vitale</i>	90
К механизму действия глюкозооксидазы	102
Влияние очищенных препаратов глюкозооксидазы (микроцида) на обмен веществ здорового животного организма.	106
Применение глюкозооксидазы в медицине и пищевой промышленности	113
Применение глюкозооксидазы для лечебных целей.	—
Применение глюкозооксидазы для аналитических целей.	116
Применение глюкозооксидазы в пищевой промышленности.	120
Влияние условий хранения микроцида на его антибиотическую активность	124
Литература	126
Приложение	133

Максим Федотович Гулый, Вера Иосифовна Билай,
Николай Макарович Пидопличко, Рита Григорьевна
Дегтярь, Елена Алексеевна Никольская

Фермент глюкозооксидаза и его применение

*Печатается по постановлению ученого совета
Института микробиологии и вирусологии
Академии наук Украинской ССР*

Редактор издательства *Т. И. Матяшевская*

Художественный редактор *И. П. Антонюк*

Оформление художника *В. М. Флакса*

Технические редакторы *Ю. Б. Дахно, Н. П. Рахлина*

Корректор *Л. Л. Данилова*

БФ 05388. Зак. № 1031. Изд. № 235. Тираж 1500.
Формат бумаги 84×108¹/₃₂. Печ. физ. листов 4,5.
Условн. печ. листов 7,38. Учетно-изд. листов 7,77.
Подписано к печати 23.VII 1964 г. Цена 39 коп.
Т. п. 1964 — п. 254.

Издательство «Наукова думка», Киев, Репина, 3.
Киевская книжная типография № 5 Государственного
Комитета Совета Министров УССР по пе-
чати, Киев, Репина, 4.

