

6  
A45

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА С С С Р  
ЛАТВИЙСКАЯ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО  
ЗНАМЕНИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ

---

На правах рукописи

М. А. Дреймане

БИОСИНТЕЗ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДРОЖЖАМИ  
**Endomycopsis fibuliger R-313**  
И ПОЛУЧЕНИЕ ТЕХНИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА С  
ГЛЮКОАМИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(Диссертация на русском языке)

05.376 Техническая микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата  
технических наук

Елгава 1972

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР  
ЛАТВИЙСКАЯ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО  
ЗНАМЕНИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ

На правах рукописи

М.А. Дреймане

БИОСИНТЕЗ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДРОЖЖАМИ  
ENDOMYCOPSIS FIBULIGER R-313 И ПОЛУЧЕНИЕ  
ТЕХНИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА С ГЛЮКО-  
АМИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

05.376 – Техническая микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Елгава 1972

## В В Е Д Е Н И Е

Направленный микробный биосинтез биологически активных соединений — одна из центральных проблем современной микробиологии.

Среди биологически активных веществ, синтезируемых микроорганизмами, особо важное место занимают ферменты.

В настоящее время в народном хозяйстве широко используют амилолитические ферментные препараты микробного происхождения, которые находят разнообразное применение при переработке крахмалсодержащего сырья. (Фениксова, Шилова, 1964, 1965, 1970, Бродавец и др. 1968 и др., Linsley, 1969, Harrison, Rowell, 1970). В течение последних десяти лет, со времени изучения фермента глюкоамилазы, гидролизующего крахмал непосредственно до глюкозы, была разработана новая технология производства глюкозы из крахмала с применением фермента (Barlow, 1967, Komaki Tomomi, 1968, Underkofler, 1969, Bachner et al., 1970 и др.).

Глюкоамилаза используется в хлебопекарной, кондитерской, спиртовой промышленности, в животноводстве, медицине.

В производственном масштабе ферментный препарат глюкоамилазы выпускают Япония, США, ФРГ, Англия, Дания.

В Советском Союзе производство глюкоамилазы пока еще не налажено и работы в этой области начаты только в 60-х годах. Фениксова со своими сотрудниками изучала и получила препарат глюкоамилазы из *Aspergillus awamori*.

Успешно проводятся работы в Московском технологическом институте пищевой промышленности под руководством проф. Веселова. В этом институте выделен ферментный препарат с высокой глюкоамилазной активностью дрожжам. *Endomycorhiza* sp. 20-9.

Выращивание продуцентов глюкоамилазы в нашей стране осуществляется либо поверхностным, либо глубинным периодическим методом культивирования. В литературе нет данных о культивировании продуцентов глюкоамилазы в условиях протока.

Задачей наших исследований являлось: подбор оптимальных условий для роста культуры *Endomycopsis fibuliger* R-313 и биосинтеза амилолитических ферментов при глубинных периодических и непрерывных методах культивирования, получение технического ферментного препарата глюкоамилазы, который мог бы найти применение в микробиологической промышленности.

Кроме того, такой препарат, содержащий помимо амилолитических ферментов также клеточную биомассу, является ценным источником белков, витаминов, ферментов и может быть использован в животноводстве.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### I. Объект и методы исследования

В качестве продуцента амилолитических ферментов использовали музейную культуру *Endomycopsis fibuliger* R-313 Института микробиологии имени Августа Кирхенштейна АН Латв. ССР.

Основная питательная среда представляла собой модифицированную синтетическую среду Ридер, из которой была исключена глюкоза и вместо нее применялся растворимый крахмал.

В качестве источника биостимуляторов с целью усиления синтеза амилолитических ферментов применяли дрожжевой автолизат, вытяжку из солодовых ростков, кукурузный экстракт, в разных соотношениях и концентрациях.

При подборе среды изучалось влияние различных источников углерода, азота, минеральных компонентов, а также витаминов группы В на рост культуры *Endomycopsis fibuliger* R-313 и синтез амилолитических ферментов.

Для подбора оптимальных соотношений концентраций компонентов среды применяли один из методов математического планирования эксперимента - метод крутого восхождения Бокса-Уилсона (Максимов, Федоров, 1969).

Выращивание продуцента амилолитических ферментов проводили глубинным и поверхностным методами. Глубинный метод культивирования осуществлялся периодическим и непрерывным способами.

В периодических условиях культуру *End. fibuliger* R-313 выращивали в лабораторных условиях в колбах объемом 0,750 л, содержащих 50 мл среды, на качалке, при 180-200 об/мин в течение 24 часов при температуре 30°C.

В условиях лабораторного стенда культуру *End. fibuliger* R-313 выращивали в 1,5 л сопло-конусных ферментерах (Бекер, Виестур, 1963; Виестур, 1965, 1966; Бекер и др., 1966). В качестве пеногасителя применяли подсолнечное масло, олеиновую кислоту или кашалотовый жир. В полупроизводственных условиях культуру выращивали в 100 л ферментерах.

Непрерывное выращивание дрожжей *End. fibuliger* R-313 провели на стендовой установке в 1,5 л ферментерах. Управление процессом осуществляли по принципу хемостата, а в качестве лимитирующего фактора использовали растворимый крахмал. Задачей первой серии опытов являлось выяснение пределов допустимых скоростей разбавления, в которых количество микробных клеток оставалось бы на постоянном уровне и культура максимально синтезировала глюкоамилазу. Использована питательная среда, на которой культура в периодических условиях синтезирует фермент с максимальной активностью. Состав этой среды следующий, %: растворимый крахмал - 0,8; кукурузный экстракт - 1,5; кашалотовый жир - 0,5;  $(NH_4)_2SO_4$  - 0,25;  $CaCl_2$  - 0,04;  $K_2HPO_4$  - 0,22.

Во второй серии опытов использована питательная среда, которая дает большее количество прироста биомассы, следующего состава, %: растворимый крахмал - 2,0; этиловый спирт - 2,0; кукурузный экстракт - 2,0;  $(NH_4)_2SO_4$  - 0,25;  $CaCl_2$  - 0,04;  $K_2HPO_4$  - 0,22.

Интервал варьирования скорости потока  $0,1 \leq D \leq D_{1,р}$ . В качестве посевного материала использовали 24-часовой инокулят, выращенный в колбах на качалке при температуре 30°C.

В работе произведен математический анализ накопления биомассы и образования амилолитических ферментов при непрерывном и периодическом методе культивирования.

При периодическом методе культивирования микроорганизмов средние величины суммарной ( $V_{cp}$ ) и удельной скорости ( $C_{cp}$ ) определяли по уравнениям:

$$V_{cp} = \frac{m_1 - m_0}{t_1 - t_0}, \quad \text{час}^{-1}$$

$$C_{cp} = \frac{2,3 (lg m_1 - lg m_0)}{t_1 - t_0}, \quad \text{час}^{-1}$$

где:

$m_0, m_1$  - количество биомассы в начале и в конце интервала времени ( $t_1 - t_0$ ) при периодическом культивировании микроорганизмов, г/л.

Физиологическая активность культуры (К) характеризует количество полученного продукта (Р), которое образуется за единицу времени единицей биомассы и определяется по следующему уравнению:

$$K = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X}, \quad \text{ед/г час}$$

При культивировании микроорганизмов в периодических условиях физиологическую активность (К) можно высчитать в промежуток времени ( $t_1 - t_0$ ) по следующему уравнению:

$$K = \frac{P}{(t_1 - t_0) m_{cp}}, \quad \text{ед/г час}$$

где:

$m_{cp}$  - среднее количество биомассы в промежуток времени.

Экономически важным показателем является продуктивность системы (П), которая выражается как произведение скорости разбавления на содержание биомассы или продукта

$$П_x = D \cdot X, \quad \text{г/л час}$$

$$П_p = D \cdot P, \quad \text{ед/мл час}$$

Для разработки оптимальных условий культивирования поверхностным методом в производственных условиях дрожжи *Eni. fibuliger R-3I3* выращивали кюветным способом в растительной камере при температуре 30°C.

Сгущение культуральной жидкости осуществляли при температуре 25-30°C в вакуумвыпарном аппарате "Синк".

Режим сушки сгущенной культуральной жидкости *Eni. fibuliger R-3I3* разрабатывали на лабораторной экспериментальной сушилке с носителем, объем диффузора которой 0,004553 м³.

Количество выросшей биомассы *Eni. fibuliger R-3I3* определяли весовым методом.

Общий азот в биомассе определяли по микрометоду Кьельдаля.

Амилолитическую активность (АА) культуральной жидкости определяли по методу Климовского-Родзевич. Декстринолитическую активность (ДА) определяли по способности гидролизовать конечные декстрины до редуцирующего сахара, которые определяли методом Бертрана. Активность глюкоамилазы (ГА) определяли по количеству глюкозы, образовавшейся при действии фермента на крахмал. Содержание глюкозы при этом определяли окислением ее глюкозооксидазой до D - глюконовой кислоты. Протеолитическую активность (ПА) определяли по методу Ансона.

За единицу амилолитической активности принимали такое количество фермента, которое способно гидролизовать 1 г растворимого крахмала за 1 час при температуре 30°C. За единицу активности глюкоамилазы принято такое количество фермента, которое вызывает образование 1 мг глюкозы из растворимого крахмала за 1 час при температуре 30°C. Единица декстринолитической способности равна количеству фермента, способного образовывать 1 мг редуцирующих сахаров за час при температуре 30°C.

Опыты проводились в 5-6 повторностях и полученные данные обработаны статистически.

Результаты исследований

I. Предварительные исследования по росту культуры *Endomycopsis fibuliger* R-313 и образованию амилолитической активности

Работу начали исследованием ростовой способности и амилолитической активности четырех музейных культур из рода *Endomycopsis*: *End. capsularis*, *End. chodeti*, *End. chameri*, *End. fibuliger*.

Предварительные опыты показали, что наиболее перспективным является *End. fibuliger*. При культивировании на полусинтетической среде Ридер накопление биомассы дрожжей достигает 3,5 г/л и в культуральной жидкости обнаружены следы амилолитических ферментов.

В дальнейшем культура *End. fibuliger* адаптировалась к модифицированной среде Ридер с минеральными солями, крахмалом и дрожжевым автолизатом, путем последовательных пересевов на косом агаре и культивирования в колбах на качалке. Примерно после 35 пассажей амилолитическая активность достигла 2,0-3,4 ед/100 мл и прирост биомассы - 4 г/л.

Процесс накапливания амилазы, как следует из рисунка I, у данной культуры дрожжей протекает параллельно росту клеточной биомассы. Амилолитическая активность и накопление биомассы достигает своего максимума через одни сутки 11 ед/100 мл и 4,15 г/л соответственно. Культура синтезирует около 80% экстрацеллюлярного фермента, а 20% амилазы локализуется в клеточной биомассе.

Культура *End. fibuliger* R-313 образует настоящий разветвленный белый мицелий с ветвящимися гифами. Мицелий неустойчив и легко расщепляется на отдельные клетки. Средняя величина клеток суточной культуры на среде Ридер с дрожжевым автолизатом следующая: диаметр 4,8-6,0 мк, длина 5,5-12 мк. Преобладающая форма овальная.

В экспоненциальной фазе роста к 16-му часу ферментации содержание условного белка в биомассе достигает максимума (56% на а/с вещество).

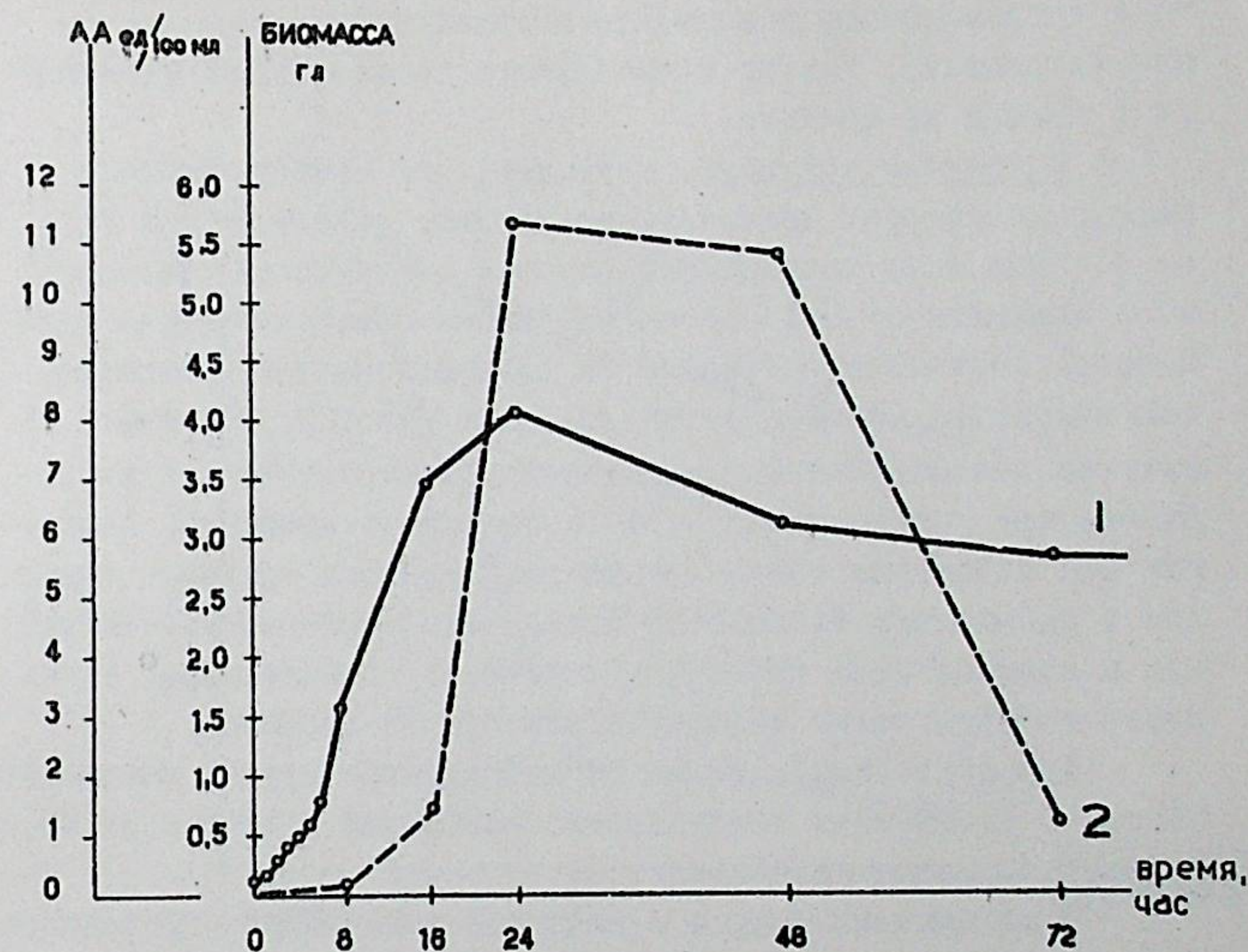


Рис. I. Динамика образования биомассы и амилазы дрожжами *Endomycopsis fibuliger* R-313.  
I - Биомасса, г/л.  
2 - Амилолитическая активность, ед/100 мл.

2. Влияние состава питательной среды на образование амилолитических ферментов и накопление биомассы глубинным способом культивирования *Endomycopsis fibuliger* R-313

Продуктивность культуры микроорганизмов в большой степени зависит от состава питательной среды и комплекса физико-химических факторов. В нашу задачу входило подо-

брать источники и оптимальные концентрации углерода, азота и органического компонента-источника биологически активных веществ. Подбор оптимального состава среды проводили в колбах на качалке.

Источники углерода. Известно, что синтез фермента обычно индуцирует вещество, на которое действует сам фермент. Нами было исследовано влияние концентрации растворимого крахмала от 0,2% до 4% на синтез амилалитических ферментов. Количество фермента не пропорционально концентрации индуктора. Исследования показали (рис.2), что самая высокая амилалитическая и глюкоамилазная активность наблюдается при концентрации 0,5% растворимого крахмала. Повышение или понижение концентрации растворимого крахмала приводит к уменьшению активности ферментов. Особенно чувствительной к концентрации субстрата оказалась глюкоамилаза, активность которой резко снижается уже при 2% крахмала.

При образовании биомассы наблюдается другая закономерность. С повышением концентрации источника углерода до 2%, прирост биомассы повышается.

В дальнейших опытах в качестве источников углеродного питания были использованы: конечные декстрины, мальтоза, сахароза, фруктоза, глюкоза, лактоза. Установлено, что максимальная амилалитическая активность наблюдается, если питательная среда содержит крахмал или декстрин в концентрации 0,5% (рис.3).

Статистическая обработка данных показала, что на глюкоамилазную активность одинаково влияет применение в среде крахмала, декстрина и мальтозы. Так как синтез глюкоамилазы индуцирует только специфический субстрат-крахмал и продукты его неполного гидролиза - имеется основание этот фермент отнести к группе индуцируемых ферментов.

На образование биомассы отрицательно влияет лактоза, принимаемая в качестве источника углерода в среде. Остальные проверенные источники углерода в одинаковой мере способствуют росту культуры.

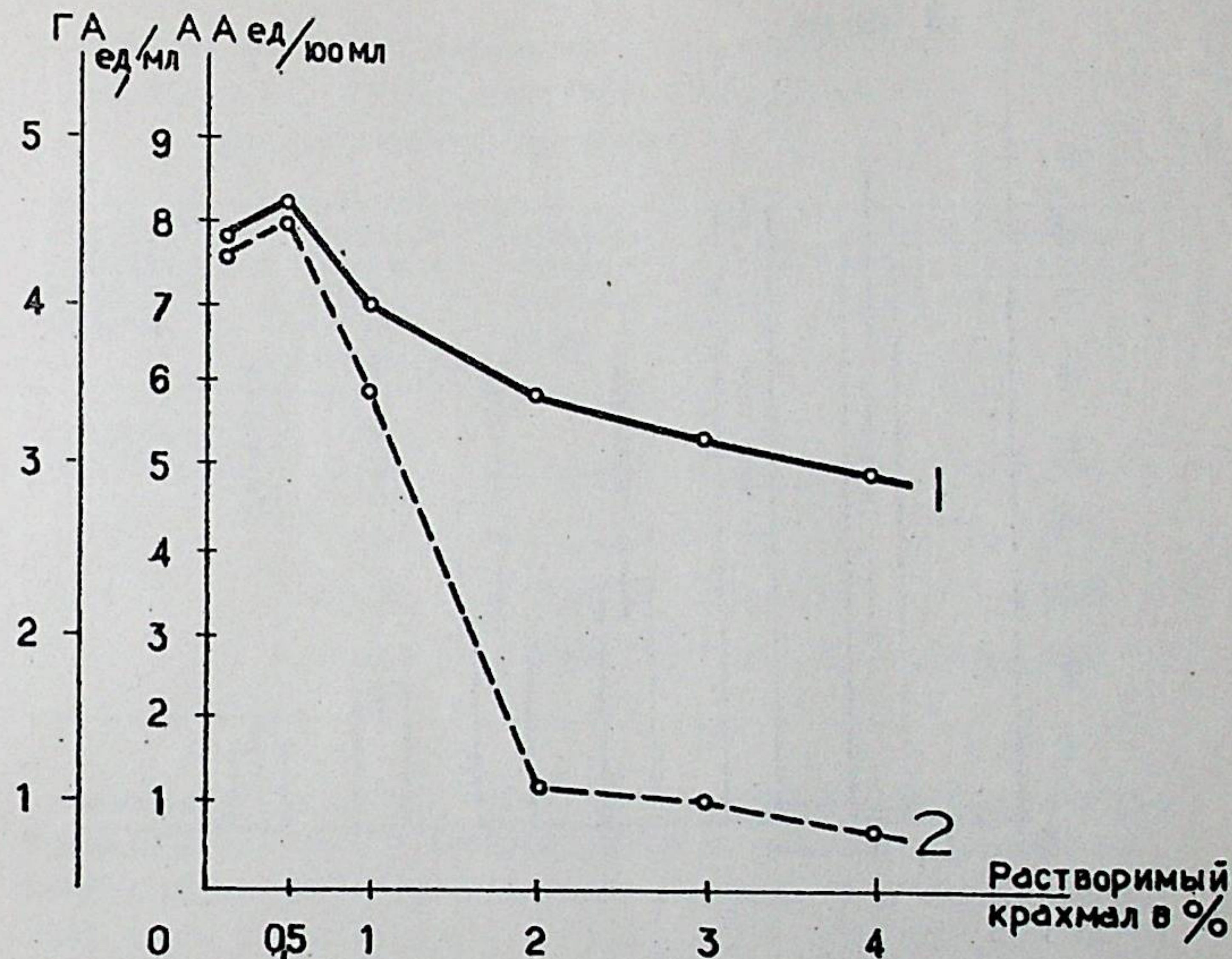


Рис. 2. Влияние концентрации растворимого крахмала на биосинтез амилалитических ферментов дрожжами *Saccharomyces fibuliger* R-313.

1 - амилалитическая активность, ед/100 мл.  
2 - глюкоамилазная активность, ед/мл.

Этиловый спирт как дополнительный источник углерода в среде с 0,5% растворимым крахмалом (табл. I) способствует накоплению биомассы, причем увеличение добавляемого количества этилового спирта повышает накопление биомассы, но полностью угнетает образование амилазы и частично глюкоамилазы. Биосинтетическая активность культуры с увеличением количества добавляемого этилового спирта также уменьшается.

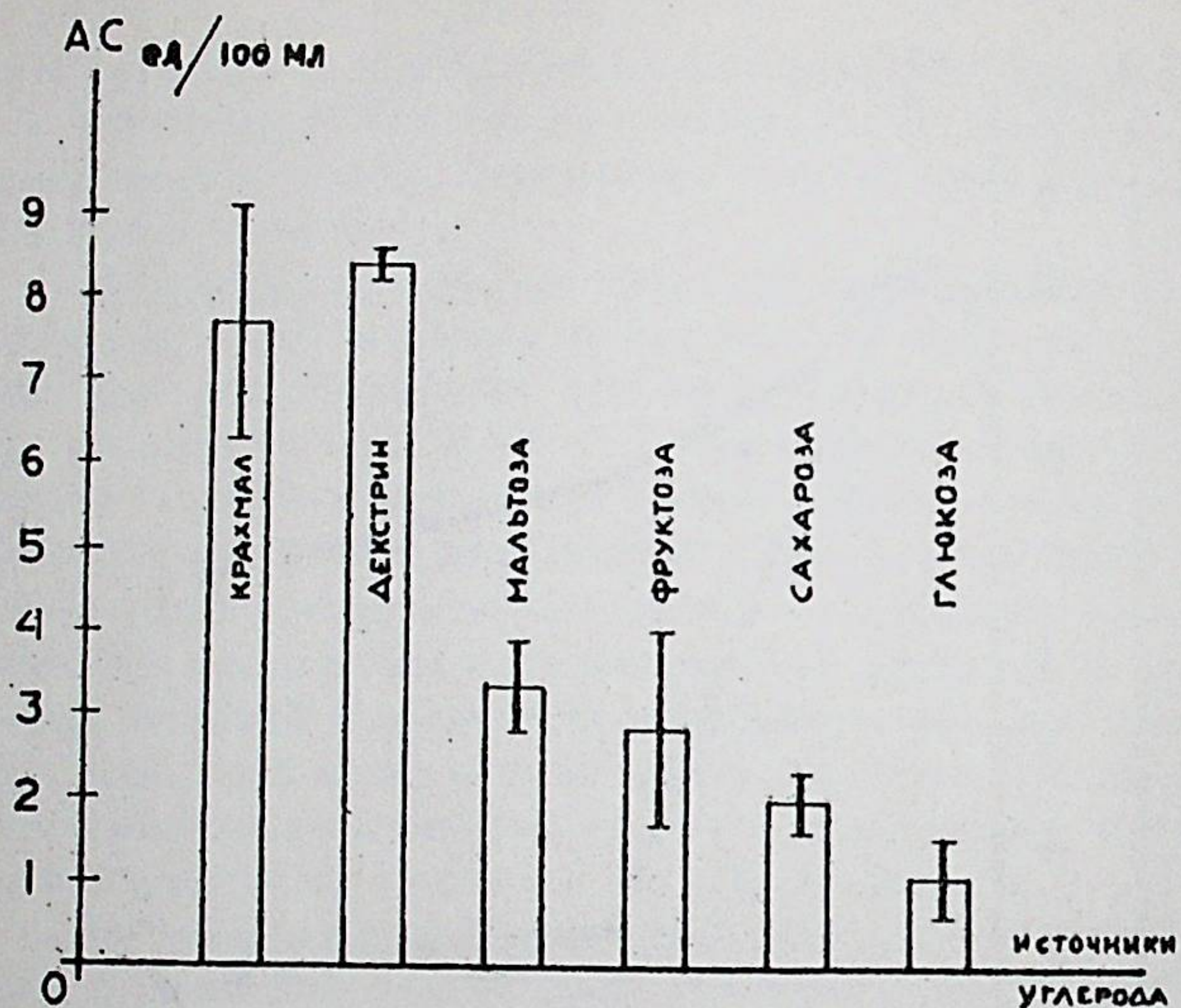


Рис.3. Влияние источника углерода на амилалитическую активность *Endomycopsis fibuliger* R-3I3.

Таблица I

Влияние этилового спирта на рост культуры *Endomycopsis fibuliger* R-3I3 и биосинтез амилалитических ферментов

Количество добавляемого этилового спирта, %	Амилалитическая активность, ед/100мл	Глюкоамилазная активность, ед/мл	Биомасса, г/л	Биосинтетическая активность $K_{Ga}$ , ед/г·час
Контроль без спирта	3,8	$18,2 \pm 0,81$	$4,3 \pm 0,19$	$0,173 \pm 0,008$
0,5	следы	$12,4 \pm 0,60$	$6,6 \pm 0,29$	$0,079 \pm 0,003$
1	следы	$11,3 \pm 0,52$	$7,1 \pm 0,33$	$0,075 \pm 0,003$
2	следы	$3,8 \pm 0,17$	$7,3 \pm 0,32$	$0,021 \pm 0,001$

Источники азота. Наряду с источниками углеродного питания большую роль в процессе синтеза амилалитических ферментов играют источники азотного питания. В качестве источника азота использовали  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $KNO_3$ ,  $NH_4NO_3$ ,  $Ca(NO_3)_2$ ,  $Mg(NO_3)_2$ , мочевины (в концентрации 0,07% по азоту).

Лучшим источником азота в среде для синтеза амилазы и глюкоамилазы дрожжами *End. fibuliger* R-3I3 оказался  $(NH_4)_2SO_4$  (рис.4,5). Для накопления биомассы культура в одинаковой мере использует  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NH_4NO_3$  и  $Ca(NO_3)_2$ .

Минеральные компоненты. Кроме того было проверено влияние минеральных солей (среда Ридер) на рост и развитие *End. fibuliger* R-3I3 и синтез амилалитических ферментов.

Исключая поочередно, указанные в таблице 2, минеральные соли, мы пришли к выводу, что соли  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $KH_2PO_4$  и  $CaCl_2$  являются необходимыми для роста и развития дрожжей *End. fibuliger* R-3I3, а также для синтеза амилалитических ферментов.

На основании полученных экспериментальных данных в дальнейших исследованиях использовали питательную среду следующего



состава (в %): растворимый крахмал -0,5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  -0,3;  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  -0,15;  $\text{CaCl}_2$  -0,033; дрожжевой автолизат -20 мл/л.

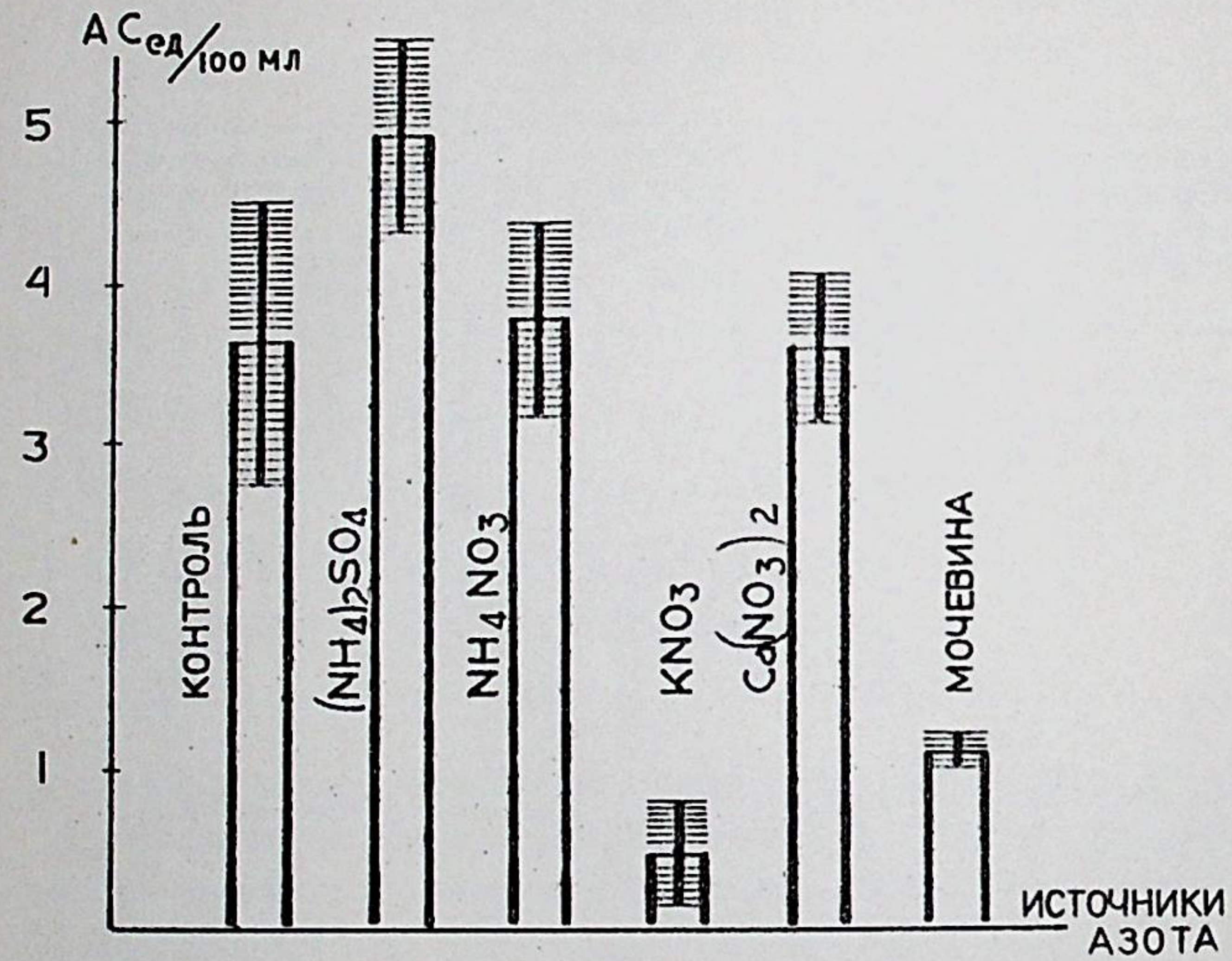


Рис. 4. Влияние источника азота на амилолитическую активность *Endomycopsis fibuliger* R-313.

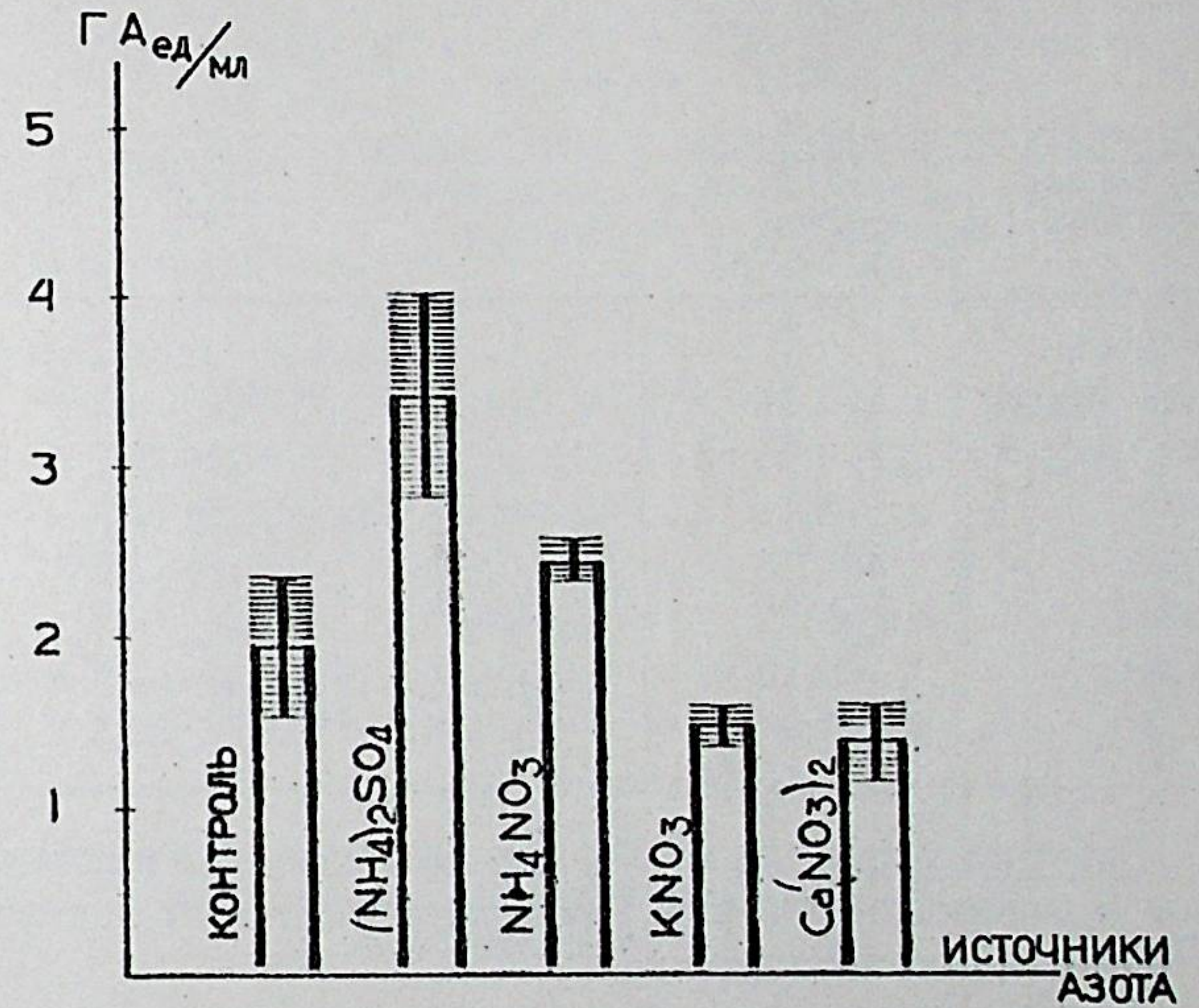


Рис. 5. Влияние источника азота на глюкоамилазную активность *Endomycopsis fibuliger* R-313.

Таблица 2

Влияние минеральных компонентов среды на рост культуры *Endomycopsis fibuliger* R-3I3 и синтез амилолитических ферментов

Исключаемый минеральный компонент, %	Амилолитическая активность, ед/100 мл	Глюкоамилазная активность, ед/мл	Биомасса, г/л
Контроль (среда Ридер)	3,3±0,16	4,0±0,18	5,2±0,23
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,1±0,05	0,8±0,04	3,6±0,17
CaCl <sub>2</sub>	0,6±0,03	0,8±0,04	4,5±0,21
MgSO <sub>4</sub>	3,3±0,16	3,0±0,14	4,6±0,22
NaCl	3,5±0,17	3,0±0,14	5,4±0,25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,4±0,12	2,4±0,12	4,0±0,17
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6±0,03	0,7±0,03	3,2±0,15

**Биостимуляторы.** Известно, что рост культуры микроорганизмов и биосинтез ферментов стимулируют природные источники биологически активных веществ.

В опытах было исследовано влияние дрожжевого автолизата, вытяжки из солодовых ростков и кукурузного экстракта и 6 витаминов гр.В в разных концентрациях и соотношениях на рост культуры *Endomycopsis fibuliger* R-3I3 и синтез амилолитических ферментов. Наилучшим источником биологически активных веществ для накопления биомассы и синтеза амилолитических ферментов оказался кукурузный экстракт в концентрации 2%, биосинтетическая активность культуры при этом достигла максимума 0,100 ед/г час.

**Пенегасители.** Ведение ферментативного процесса в ферментерах требовало добавления пеногасителей. Влияние пеногасителей-олеиновой кислоты и кашалотового жира на синтез глюкоамилазы показано в табл.3. Как видно, кашалотовый жир, содержащий более полный комплекс жирных кислот, в большей степени способствует биосинтезу глюкоамилазы, причем, с увеличением концентрации кашалотового жира, увеличивается активность глюкоамилазы.

Таблица 3

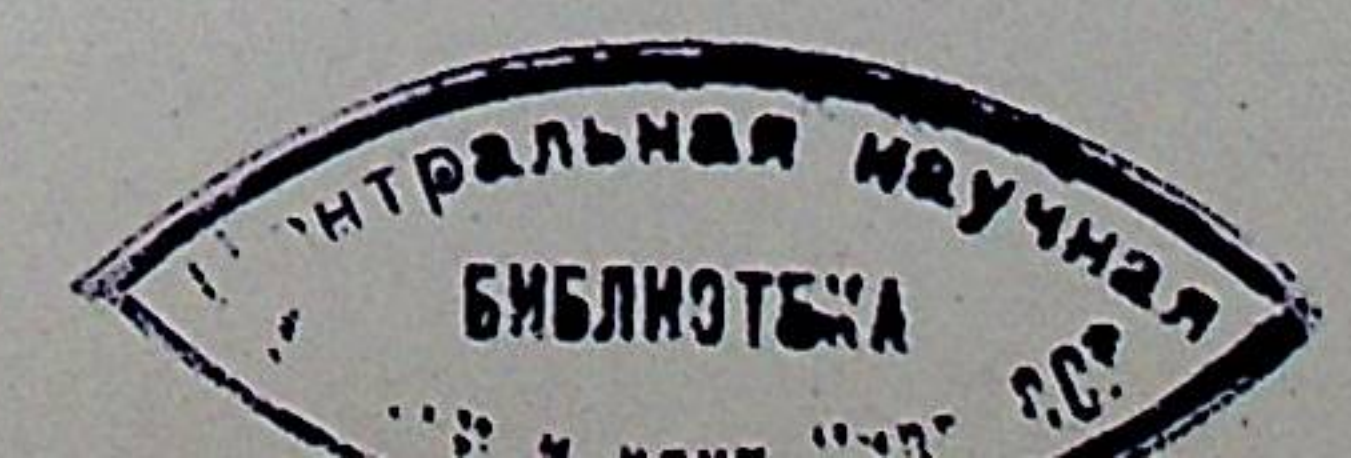
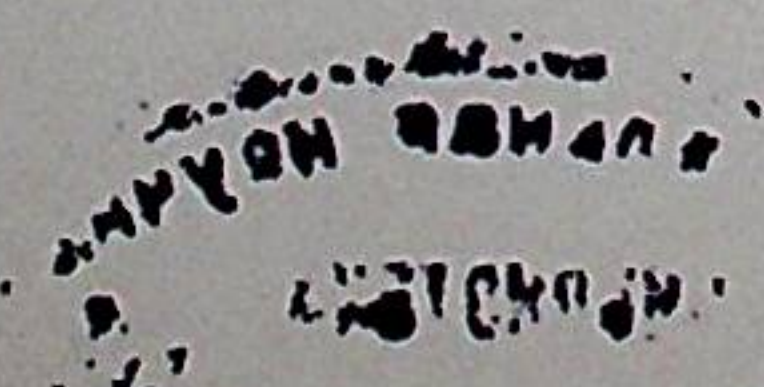
Влияние олеиновой кислоты и кашалотового жира на биосинтез глюкоамилазы дрожжами *Endomycopsis fibuliger* R-3I3

Среда с олеиновой к-той и кашалотовым жиром	Конц. биостимуляторов, %	Глюкоамилазная активность, ед/мл
Питательная среда + олеин. кислота	1	34 ± 1,5
"	2	34 ± 1,4
Питательная среда + кашалот. жир	1	43 ± 1,8
"	2	50 ± 2,0
Контроль без олеин.к-ты и кашалот. жира	0	24 ± 1,1

3. Оптимизация состава среды для биосинтеза глюкоамилазы культурой *Endomycopsis fibuliger* R-3I3

С целью уточнения оптимальных соотношений компонентов питательной среды применяли один из методов математического планирования эксперимента - метод крутого восхождения Бокса-Уилсона (Максимов, Федоров, 1969), который ускорил наши исследования.

Ранее была подобрана для культивирования дрожжей *End.fibuliger* R-3I3 полусинтетическая среда с 0,5% растворимого крахмала и среда с применением 2% кукурузной муки в качестве источника углерода. Первая исходная питательная среда имела следующий состав, %: крахмал -0,5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> -0,33; CaCl<sub>2</sub> -0,03; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -0,15; кукурузный экстракт -2,0; кашалотовый жир -1,0; Вторая исходная среда имела следующий состав, %: кукурузная мука -2,0; кукурузный экстракт -2,0; кашалотовый жир -1,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> -0,33; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -0,15; CaCl<sub>2</sub> -0,03. Для выбора оптимального состава среды изменяли концентрацию ее составных компонентов.



В основу планирования эксперимента была положена матрица дробного факторного эксперимента ДФЭ  $2^{6-2}$ . Эта матрица предусматривает 16 вариантов сред с одновременным варьированием концентраций всех шести факторов на двух уровнях. Интервалы варьирования ( $A_i$ ) для изучаемых факторов были выбраны с таким расчетом, чтобы разница в значениях фактора на верхнем и нижнем уровнях явно отразилась на величине выхода.

На основании полученных данных о глюкоамилазной активности были рассчитаны коэффициенты регрессии. По абсолютным величинам коэффициентов регрессии судили о значимости каждого фактора, входящего в состав питательной среды. Существенным фактором первой питательной среды для биосинтеза глюкоамилазы является растворимый крахмал и существенными факторами второй питательной среды - кукурузная мука и кашалотовый жир. По данным факторного эксперимента была рассчитана серия опытов по крутому восхождению. В результате работы подобрана первая питательная среда следующего состава, %: растворимый крахмал - 0,8; кашалотовый жир - 0,5; кукурузный экстракт - 1,5;  $(NH_4)_2SO_4$  - 0,25;  $CaCl_2$  - 0,04;  $KH_2PO_4$  - 0,22. Вторая питательная среда имела следующий состав, %: кукурузная мука - 1,2; кукурузный экстракт - 1,0; кашалотовый жир - 1,12;  $(NH_4)_2SO_4$  - 0,33;  $CaCl_2$  - 0,03;  $KH_2PO_4$  - 0,15.

В результате проведенной работы удалось повысить активность глюкоамилазы дрожжей *End.fibuliger R-313* по сравнению с активностью этой культуры в средах неоптимизированного состава (рис.6).

Полупроизводственные опыты. С целью уточнения способности культуры *End.fibuliger R-313* синтезировать глюкоамилазу в полупроизводственных условиях на подобранных оптимальных средах, мы проводили опыты выращивания дрожжей *End.fibuliger R-313* в 100 л ферментерах с 50-60 л питательной среды. Результаты показали, что при культивировании *End.fibuliger R-313* в полупроизводственных условиях достигается та же глюкоамилазная активность, что и в колбах на ка-

чалке ( $GA=50-60$  ед/мл), но процесс биосинтеза ферментов ускоряется 3-4 раза. Протеолитическая активность культуральной жидкости составляет 13,3 ед/100 мл.

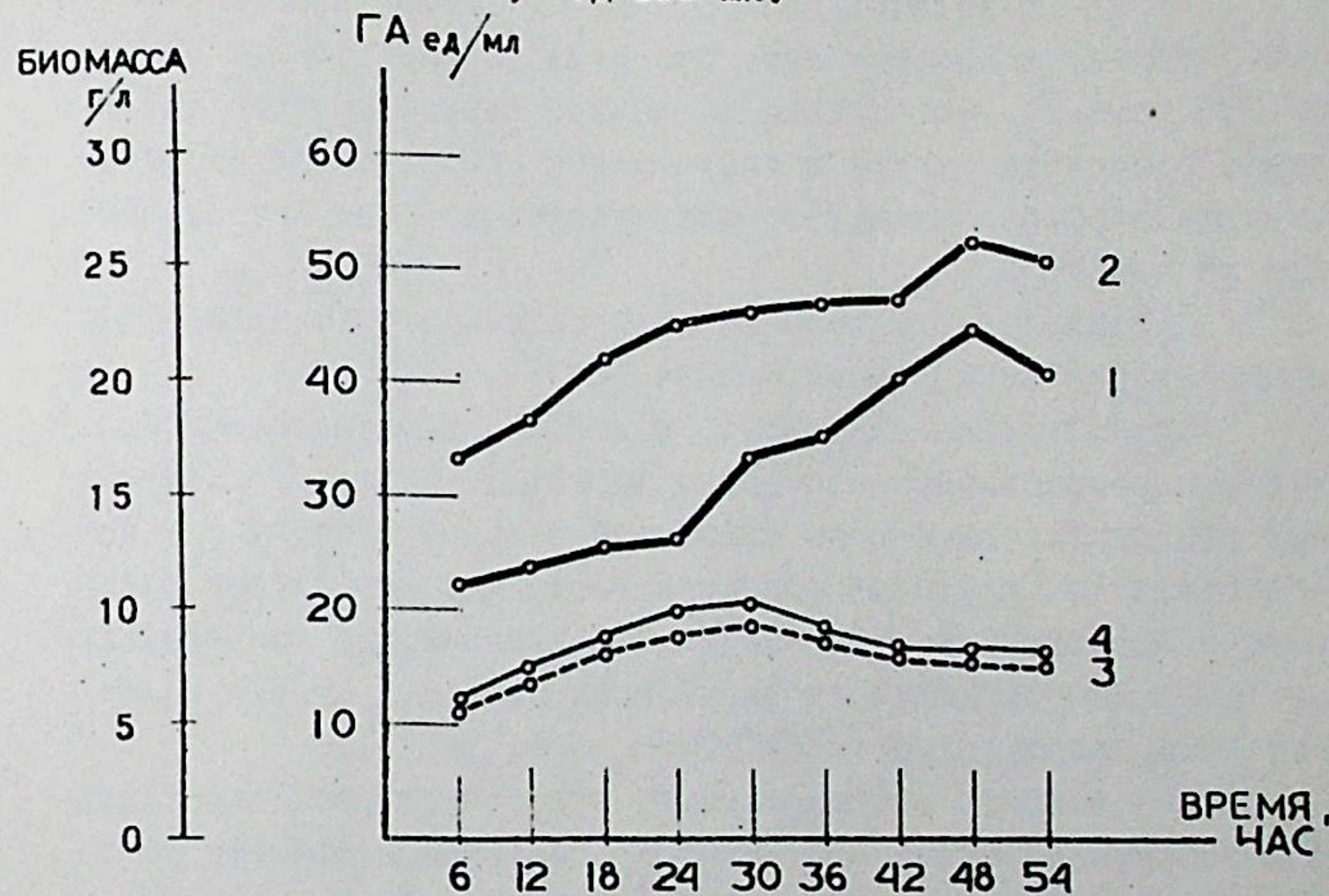


Рис.6. Глюкоамилазная активность и биомасса на исходной и подобранной средах.  
 1 - Глюкоамилазная активность на исходной среде.  
 2 - Глюкоамилазная активность на подобранной среде.  
 3 - Биомасса на исходной среде.  
 4 - Биомасса на подобранной среде.

Это объясняется интенсификацией массообменных процессов, благодаря увеличению аэрации и перемешиванию среды.

4. Влияние условий культивирования на рост культуры *Endomycopsis fibuliger R-313* и синтез амилолитических ферментов

Обмен веществ у микроорганизмов находится в прямой зависимости от внешних условий культивирования. Из факто-

ров внешней среды наиболее существенно на рост микроорганизмов и биосинтез ферментов влияет температура культивирования, pH и аэрация среды.

По нашим данным, *End.fibuliger* R-3I3 наиболее активно образует глюкоамилазу при нейтральной реакции среды pH 7,0 (рис.7). Накопление клеточной биомассы более интенсивно происходит также в нейтральной среде. Самая высокая амилолитическая активность наблюдается в более кислой зоне, при pH 5,5 +6,5.

Максимальная глюкоамилазная активность достигается при температуре культивирования 32°C.

Существенное влияние на развитие любой аэробной культуры микроорганизмов оказывает кислород. Согласно современных представлений о роли кислорода в жизнедеятельности микроорганизмов, кислород является не только акцептором электронов, компонентом органических соединений, но кислород является также регулятором ферментных систем в клетке и может быть также ингибитором (Harrisson, 1971).

Для каждого микроорганизма существует свой определенный оптимум аэрации, при котором создаются наилучшие условия его развития и синтеза биологически активных веществ.

Рост культуры *End.fibuliger* R-3I3 и синтез амилолитических ферментов в большей степени зависят также от интенсивности аэрации.

Нами было изучено влияние различных уровней аэрации на развитие культуры *End.fibuliger* R-3I3 и образование амилолитических ферментов. опыты проводили в сопло-конусных ферментерах при интенсивности аэрации ( $K_v$ ) от 80 до III мг  $O_2$ /л мин.

Самая высокая глюкоамилазная активность (59 ед/мл) и также амилолитическая активность достигаются при более интенсивной аэрации  $K_v=III$  мг  $O_2$ /л мин.

С увеличением интенсивности аэрации (рис.8) наблюдается также тенденция культуры повысить накопление биомассы. Наивысшую удельную скорость роста  $C_{cp}=0,16$ , час<sup>-1</sup> культу-

ра *End.fibuliger* R-3I3 показала на 7-ом часу культивирования. Удельная скорость роста после 7 часов замедляется, но прирост биомассы продолжается до 18 часов культивирования.

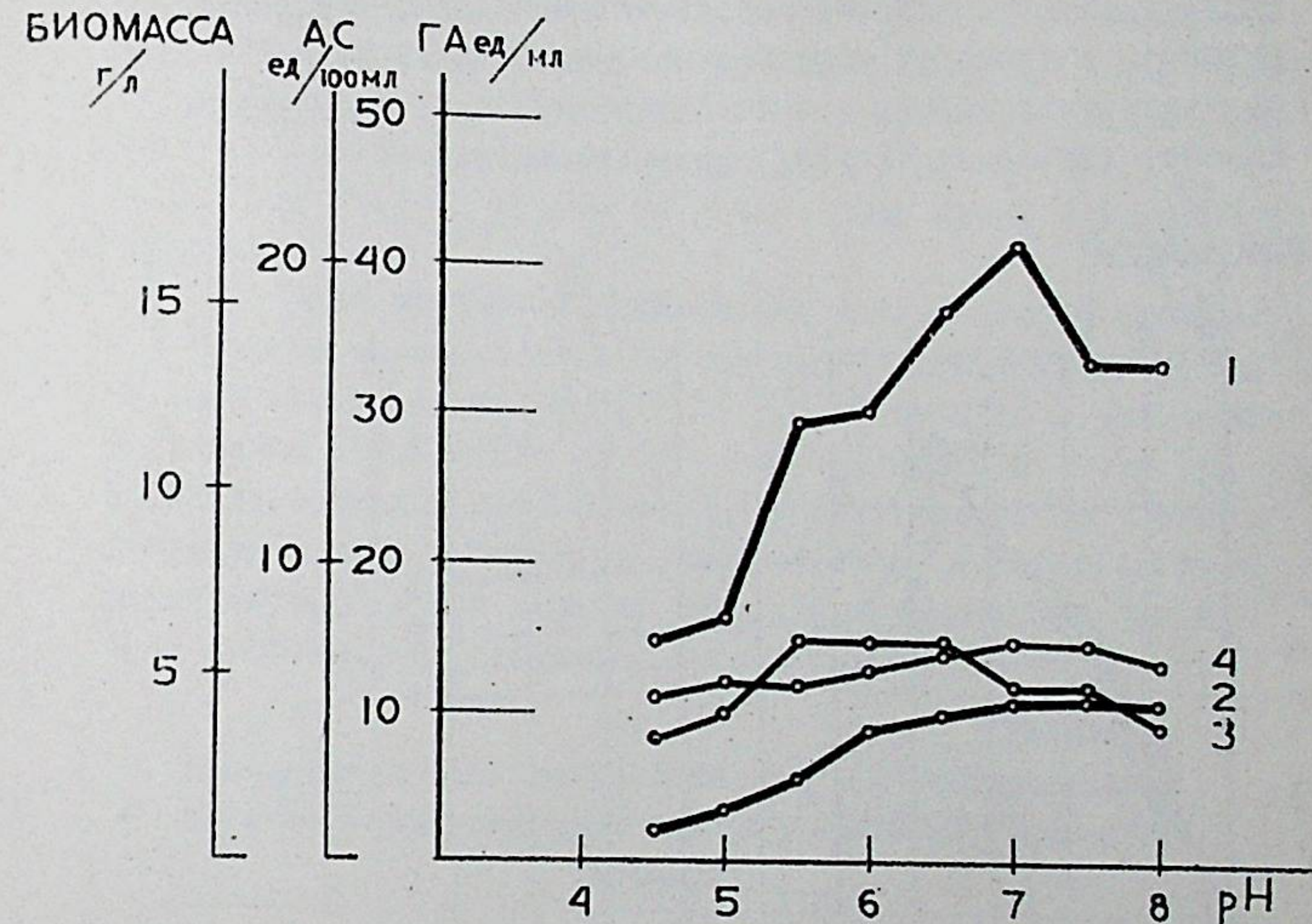


Рис.7. Влияние pH среды на рост культуры *End.fibuliger* R-3I3 и биосинтез амилолитических ферментов.

- 1 - Глюкоамилазная активность в культуральной жидкости.
- 2 - Глюкоамилазная активность в фильтрате.
- 3 - Амилолитическая активность в культуральной жидкости.
- 4 - Биомасса.

Среднее время, необходимое для получения одной генерации в экспоненциальной фазе роста от 4 до 7 часов равна  $4 \text{ час} \leq g \leq 5 \text{ час}$ .

Образование амилолитических ферментов в колбах на качалке происходит значительно медленнее, чем в лабораторных ферментерах при более интенсивной аэрации среды.

Максимальная амилолитическая активность в колбах наблюдается на 24 часу культивирования, а в лабораторных ферментерах на 12-15 часу культивирования. Более интенсивная аэрация требуется для биосинтеза глюкоамилазы, которая свой максимум активности достигает в ферментерах на 12-15 часах культивирования, а в колбах на качалке, где аэрация слабее, только на 48 часу культивирования.

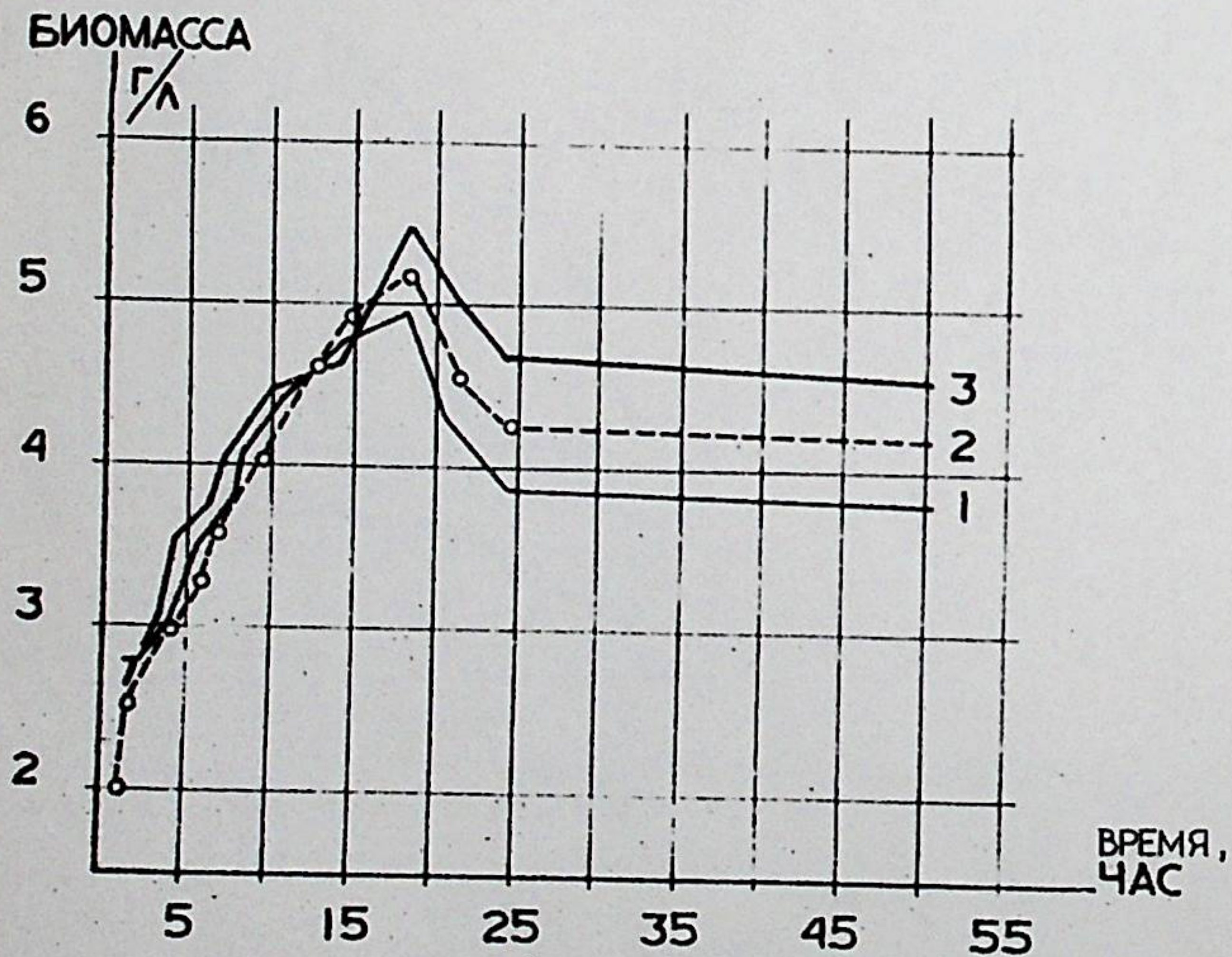


Рис. 8. Зависимость накопления биомассы дрожжей *Saccharomyces fibuliger* R-313 от интенсивности аэрации среды.

- 1 - Накопление биомассы при интенсивности аэрации 50 мг O<sub>2</sub>/л мин.
- 2 - Накопление биомассы при интенсивности аэрации 80 мг O<sub>2</sub>/л мин.
- 3 - Накопление биомассы при интенсивности аэрации 110 мг O<sub>2</sub>/л мин.

Максимальный уровень биомассы в ферментерах достигается на 18 часу культивирования, а в колбах на качалке на 24 часу.

Максимальная физиологическая активность по образованию глюкоамилазы и α-амилазы культуры ( $K_{ГА} = 0,522$  ед/г час;  $K_{АА} = 0,22$  ед/г час), выше в сошло-конусных ферментерах при более интенсивной аэрации, чем в колбах на качалке ( $K_{ГА} = 0,300$  ед/г час;  $K_{АА} = 0,146$  ед/г час) при менее интенсивной аэрации.

С целью уточнения оптимальной интенсивности аэрации для синтеза глюкоамилазы, последующие опыты проведены при интенсивности аэрации 2,0; 2,2; 2,5 м<sup>3</sup> воздуха в час, соответственно 110, 122, 138 мг O<sub>2</sub>/л мин. Установлено, что при интенсивности аэрации 122 мг O<sub>2</sub>/л мин (рис. 9) происходит наиболее активный биосинтез глюкоамилазы. Дальнейшее повышение интенсивности аэрации приводит к торможению биосинтеза глюкоамилазы дрожжами *Saccharomyces fibuliger* R-313.

Таблица 4  
Биосинтетическая активность  $K_{ГА}$  (по образованию глюкоамилазы) культуры при различной интенсивности аэрации

Показатели	Един. изм.	$K_v$ , мг O <sub>2</sub> /л мин				
		50	80	110	122	138
Биомасса	г/л	4,3 ±0,2	4,6 ±0,2	5,0 ±0,2	5,2 ±0,2	5,2 ±0,2
Глюкоамилазная активность	ед/мл	24,5 ±1,0	28,0 ±1,2	34,0 ±1,3	46,0 ±1,8	38,0 ±1,7
Биосинтетическая активность $K_{ГА}$	ед/г час	0,379 ±0,017	0,405 ±0,019	0,453 ±0,020	0,589 ±0,024	0,487 ±0,022

По данным таблицы 4 видно, что при увеличении интенсивности аэрации, возрастает и биосинтетическая активность культуры, однако при уровне аэрации 138 мг O<sub>2</sub>/л мин уменьшается биосинтетическая активность культуры за единицу вре-

мени единицей биомассы.

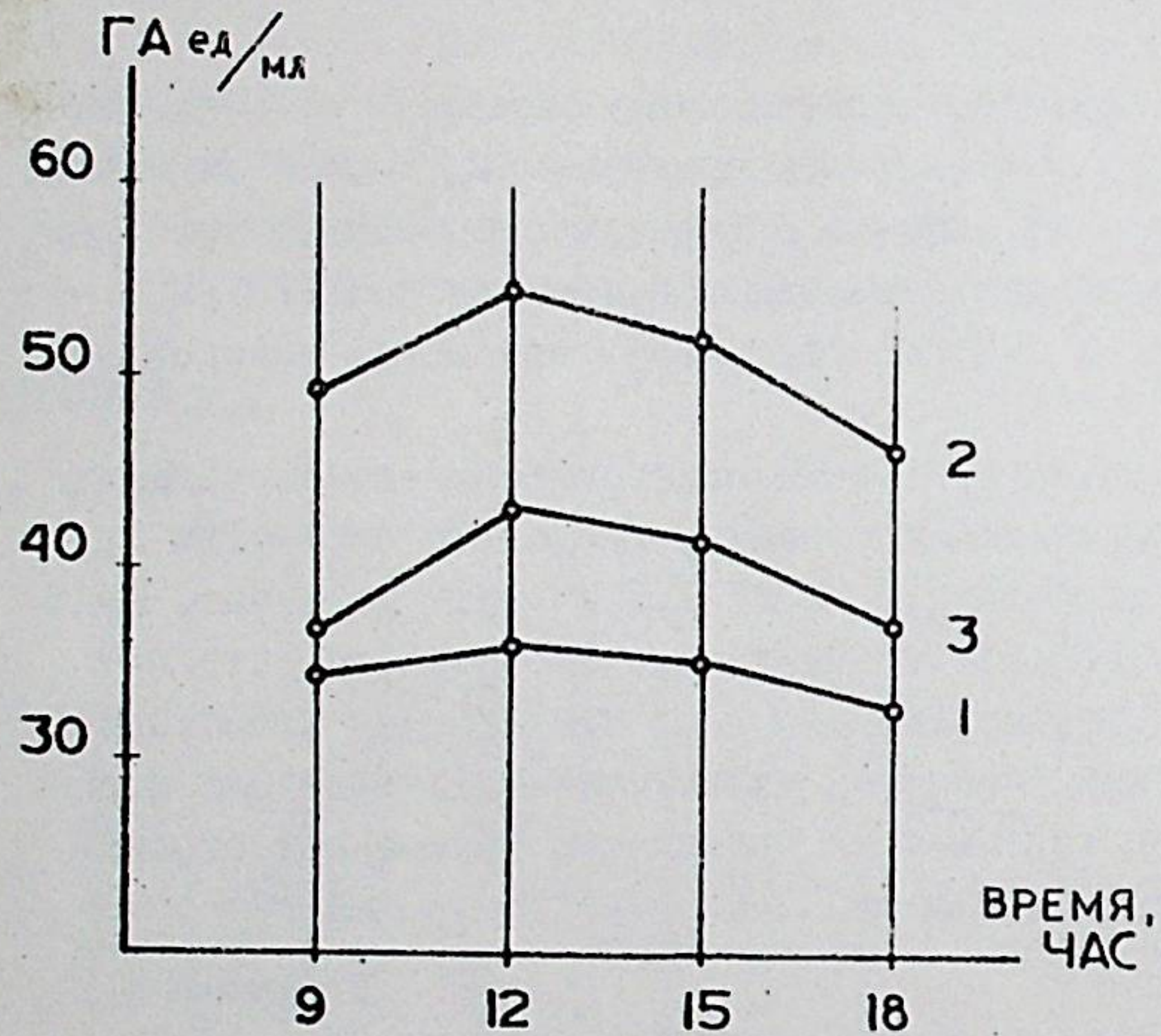


Рис.9. Зависимость образования глюкоамилазы дрожжами *End. fibuliger R-313* от интенсивности аэрации среды в сопло-конусных ферментерах.

- 1 - Глюкоамилазная активность ед/мл при интенсивности аэрации 10 мг O<sub>2</sub>/л мин.
- 2 - Глюкоамилазная активность ед/мл при интенсивности аэрации 22 мг O<sub>2</sub>/л мин.
- 3 - Глюкоамилазная активность ед/мл при интенсивности аэрации 38 мг O<sub>2</sub>/л мин.

5. Некоторые свойства глюкоамилазы культуральной жидкости *Endomycopsis fibuliger R-313*

В ходе работы нами были подобраны оптимальные условия для действия глюкоамилазы культуральной жидкости дрожжей *End. fibuliger R-313*. Оптимальной температурой для действия глюкоамилазы оказалась 39°C.

Оптимальный pH для действия глюкоамилазы является 5,0. Отклонение реакции среды в сторону более кислой или щелочной зоны приводит к уменьшению глюкоамилазной активности.

С целью изучения термостабильности глюкоамилазы, повышали температуру культуральной жидкости с 30°C до 55°C с интервалами 5°. При соответствующих температурах культуральную жидкость выдерживали 15 и 30 минут и затем определяли глюкоамилазную активность. При температуре выше 45°C глюкоамилаза очень резко инактивируется.

6. Проточное культивирование дрожжей *Endomycopsis fibuliger R-313*

При выращивании микроорганизмов периодическим методом состав питательной среды непрерывно изменяется: с увеличением содержания биомассы постепенно уменьшается количество питательных веществ и одновременно накапливаются метаболиты микроорганизмов. В связи с этим происходит непрерывная перестройка ферментных систем микроорганизмов.

Непрерывное культивирование микроорганизмов позволяет сохранять постоянные условия среды и в связи с этим стабилизировать культуру в желательном физиологическом состоянии.

Скорость накопления биомассы проточной культуры характеризуется следующим уравнением:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX$$

где:

- $\mu$  - уд. скорость роста биомассы при непрерывном культивировании микроорганизмов, час<sup>-1</sup>.
- $X$  - количество биомассы в интервале времени при непрерывном культивировании, г/л
- $D$  - коэффициент разбавления, который выражает отношение скорости притока среды (F) к объему культуральной жидкости (V), т.е. :

$$D = \frac{F}{V}$$

В непрерывной системе устанавливается равновесное состояние  $\frac{dX}{dt} = 0$ , т.е., когда коэффициент разбавления численно равняется удельной скорости роста проточной культуры  $D = \mu$ .

С изменением коэффициента разбавления  $D$  соответственно меняется скорость роста культуры. Если не превышают критическую скорость разбавления, то культура способна к установлению динамического равновесия, но, если превышают критическую скорость разбавления, то клетки постепенно вымываются из культиватора и их количество снижается до нуля.

Управление процессом осуществлялось по принципу хемостата, в гомогенном процессе, при котором удалось обеспечить равенство  $\mu = D$ .

В первой серии опытов использована питательная среда, на которой культура в периодических условиях синтезировала фермент с максимальной активностью. Культуру выращивали при  $K_v = 110$  мг  $O_2$ /л мин и  $0,1 \leq D \leq D_{кр}$ . В наших экспериментах для достижения равновесия оказалось достаточным несколько часов. Каждое равновесное состояние поддерживали 12 часов при  $D = const.$ . Из данных эксперимент видно (рис. 10), что максимальная глюкоамилазная активность наблюдается при  $D = 0,2$ , час<sup>-1</sup> и составляет 62 ед/мл. С увеличением  $D$  способность синтезировать глюкоамилазу культурой *End. fibuliger R-313* уменьшается, хотя еще при увеличении удельной скорости роста до  $0,27$ , час<sup>-1</sup> система находится в равновесии. Максимальное накопление биомассы ( $X$ ) составляет 11 г/л при  $D = 0,20$ , час<sup>-1</sup>.

Из таблицы 5 видно, что при увеличении удельной скорости роста культуры от  $0,10$  до  $0,20$  час<sup>-1</sup>, повышается и ее физиологическая активность по отношению синтеза глюкоамилазы и достигает максимум  $5,700$  ед/г час при удельной скорости роста  $0,20$ , час<sup>-1</sup>. Таким образом при увеличении удельной скорости роста ( $\mu$ ) в два раза, биосинтетическая активность также увеличивается в два раза (от  $2,844$  до  $5,700$  ед/г час). Повышение удельной скорости роста  $\mu$  до

$0,20$ , приводит к снижению биосинтетической активности.

Таблица 5

Биосинтетическая активность проточной культуры *End. fibuliger R-313* при различной удельной скорости роста

Показатели	Един. изм.	Удельная скорость роста, час <sup>-1</sup>			
		0,10	0,15	0,20	0,27
Биомасса	г/л	10,9 ±0,4	10,8 ±0,4	11,0 ±0,5	10,5 ±0,4
Глюкоамилазная активность	ед/мл	31,0 ±1,3	58,0 ±2,4	62,0 ±2,5	28,0 ±1,3
Биосинтетическая активность фермента	ед/г час	2,844 ±0,122	5,370 ±0,222	5,700 ±0,238	2,666 ±0,115

Экономически важным показателем при непрерывном культивировании является продуктивность культуры, который показывает, какое количество биомассы или продукта получают в единице объема ферментера за час, г/л час или ед/мл час. Максимальная продуктивность культуры по образованию биомассы  $2,84$  г/л час достигается при  $D = 0,27$ , час<sup>-1</sup>, а максимальная продуктивность культуры по образованию фермента  $12,4$  ед/мл час достигается при  $D = 0,20$ , час<sup>-1</sup>.

Во второй серии опытов ставилась задача изучить влияние повышенного содержания крахмала на рост культуры при различных скоростях потока. В данной серии опытов использовали питательную среду, которая дает большее количество биомассы. В качестве источника углерода использовали растворимый крахмал в концентрации 2%. При повышенном содержании источника углерода, повысили и коэффициент массообмена по кислороду ( $K_v$ ) до  $122$  мг  $O_2$ /л мин. Из рисунка 11 видно, что система находится в равновесии при  $0,10 \leq D \leq 0,27$ .

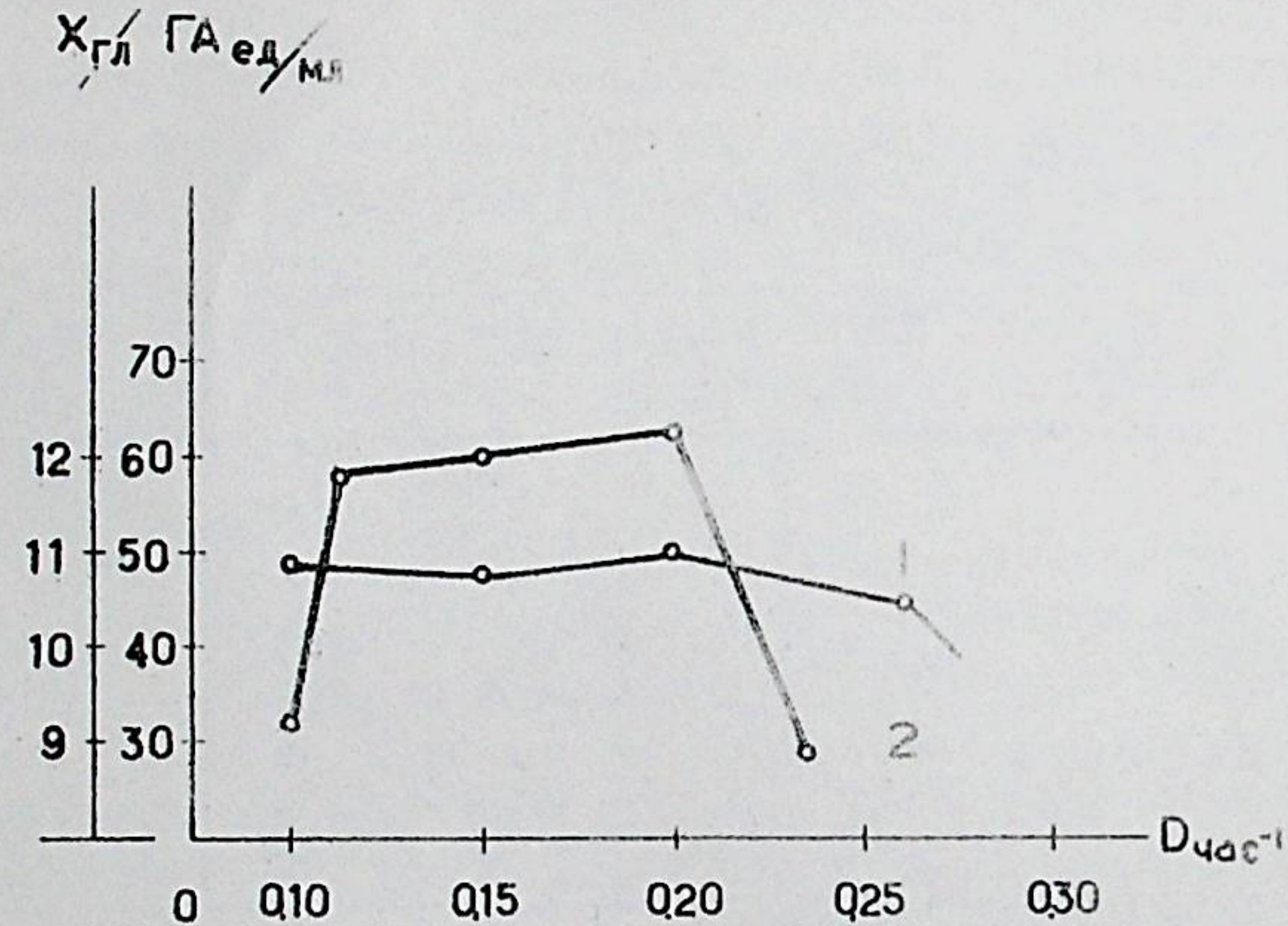


Рис.10. Образование биомассы *Endoglycoris fibuliger* R-313 и глюкоамилазы в зависимости от коэффициента разбавления.

1 - Биомасса, г/л

2 - Глюкоамилазная активность, ед/мл.

Увеличение  $D > 0,27$  приводит к вымыванию микробных клеток из ферментера. Максимальное накопление биомассы 21 г/л устанавливается при  $D = 0,27, \text{ час}^{-1}$ . Так же как в первой серии опытов при концентрации растворимого крахмала - 0,8%, во второй серии опытов содержание биомассы в системе практически остается постоянной при изменении  $D$  в пределах  $0,1 \leq D \leq 0,27, \text{ час}^{-1}$ . Биосинтетическая активность культуры  $K_{GA} = 1,1 \text{ ед/г час}$ .

Экономический коэффициент ( $Y$ ) определяется в опытах:

1) как соотношение между образовавшейся биомассы или фермента и употребленного источника углерода ( $S_0 = S_0 - S$ ):

$$Y_X^{(1)} = \frac{\Delta X}{S} \quad , \quad Y_P^{(2)} = \frac{\Delta P}{S}$$

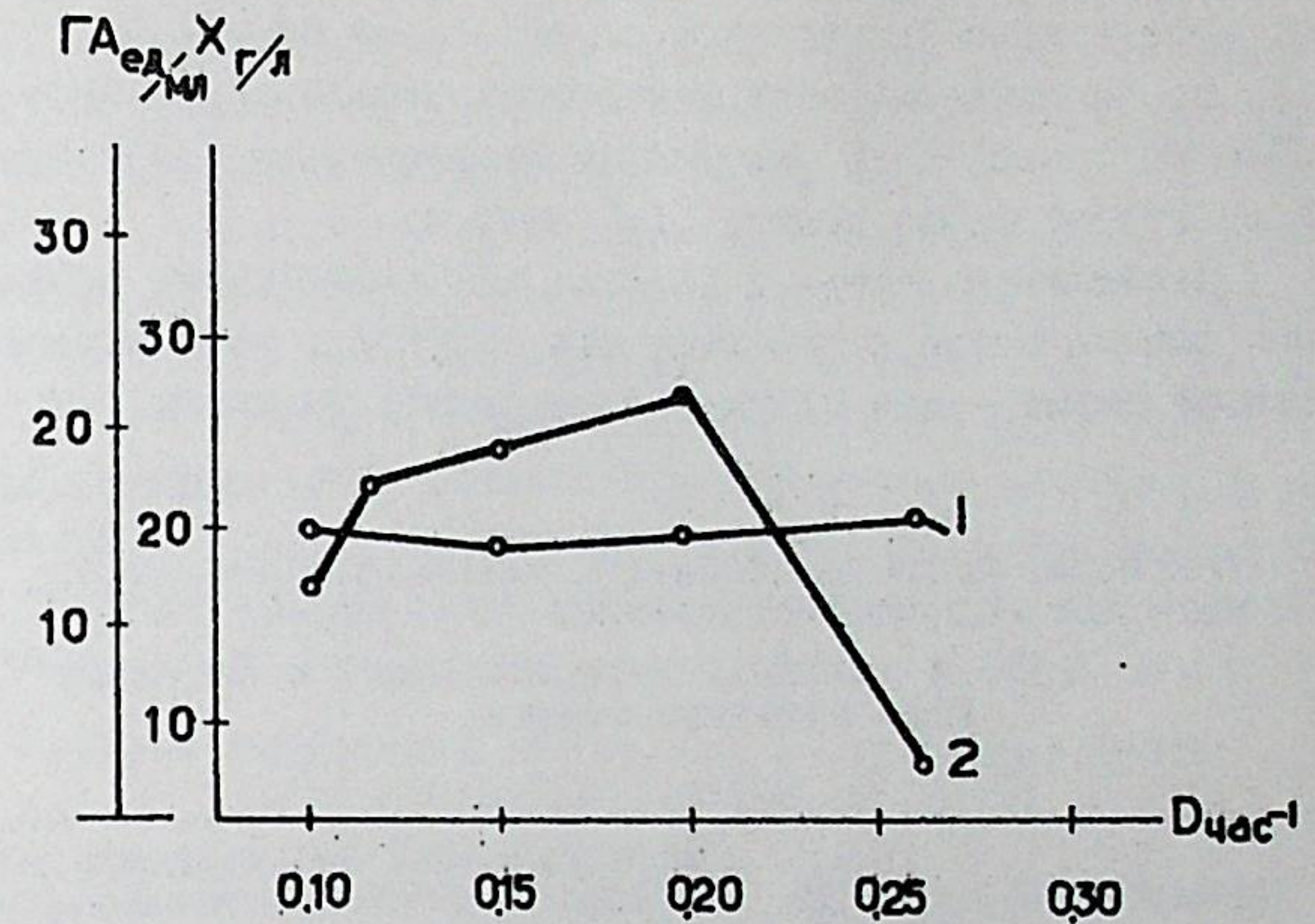


Рис.11. Образование биомассы *End. fibuliger* R-313 и глюкоамилазы в зависимости от коэффициента разбавления.

1 - Биомасса, г/л

2 - Глюкоамилазная активность, ед/мл

2) как соотношение между образовавшейся биомассой или ферментом и заданном количестве крахмала в питательной среде ( $S_0$ ),

$$Y_X^{(2)} = \frac{\Delta X}{S_0} \quad , \quad Y_P^{(2)} = \frac{\Delta P}{S_0}$$

По нашим экспериментальным данным, в процессе ферментации культурой использован практически весь крахмал и поэтому

$$Y_P^{(1)} = Y_P^{(2)}$$

Продуктивность культуры по образованию биомассы



при  $D = 0,27$ , час<sup>-1</sup> равняется 5,67 ед/л час. Во второй серии опытов продуктивность (5,67 г/л час) в два раза превышает продуктивность культуры первой серии опытов (2,84 г/л час), но биосинтетическая активность первой серии опытов (5,700 ед/г час) пять раз больше биосинтетической активности во второй серии опытов (1,1 ед/г час).

Питательная среда и условия культивирования первой серии опытов более подходящие для получения глюкоамилазы, а второй серии - для получения микробной биомассы.

таблица 6

Некоторые физиологические и экономические показатели при выращивании дрожжей *Endomycopsis fibuliger* R-313 в условиях периодического и непрерывного культивирования.

Показатели	Ед. изм.	Периодический способ культивирования	Непрерывный способ культивирования
Удельная скорость роста	час <sup>-1</sup>	0,16	0,27
Время генерации	час	4,3	2,6
Биосинтетическая активность	ед/г час	0,589	5,700
Продуктивность по биомассе, D · X	г/л час	0,33	5,67
Продуктивность по продукту, D · P	ед/мл час	2,0	12,4

Из данных таблицы 6 видно, что непрерывное культивирование дрожжей *Endomycopsis fibuliger* R-313 имеет ряд преимуществ по сравнению с периодическим способом культивирования. Удельная скорость роста при непрерывном культивировании выше (0,27, час<sup>-1</sup>), чем при периодических условиях культивирования (0,16, час<sup>-1</sup>). Причем в периодических условиях культивирования удельная скорость роста поддерживается

очень короткое время в экспоненциальной фазе роста, а в условиях непрерывного культивирования удельная скорость роста возможно поддерживать долгое время. Время генерации в протоке также составляет 2,6 часа, но при периодическом культивировании в экспоненциальной фазе роста 4,3 часа в течение нескольких часов. Биосинтетическая активность культуры по биосинтезу глюкоамилазы в протоке в 10 раз выше (5,700 ед/г час) чем при культивировании *End. fibuliger* R-313 в периодических условиях (0,589 ед/г час). При непрерывном культивировании продуктивность по образованию биомассы 16 раз и по образованию продукта 6 раз выше соответствующих продуктивностей при периодическом культивировании дрожжей *End. fibuliger* R-313.

#### 7. Биомасса дрожжей *Endomycopsis fibuliger* R-313 как источник белка

При культивировании дрожжей *End. fibuliger* R-313 в оптимизированной крахмальной среде периодическим способом, в каждом литре среды накапливается до 11 г биомассы. Установлено, что биомасса содержит около 45% условного белка. Данная культура отличается высокой скоростью роста и синтеза амилолитических ферментов. Уже на 12-18 часу культивирования в периодических условиях наблюдается максимальное накопление биомассы и амилолитических ферментов. С целью получения микробной биомассы (20 г/л) культуру *End. fibuliger* R-313 возможно выращивать по более прогрессивному непрерывному методу культивирования.

Биомасса дрожжей *End. fibuliger* R-313 содержит весь комплекс незаменимых аминокислот. Это означает, что *End. fibuliger* R-313 может служить не только продуцентом амилолитических ферментов, но и продуцентом микробного протеина на базе крахмального сырья. Необходимо продолжить работы по повышению содержания белка в биомассе дрожжей *End. fibuliger* R-313.

### 8. Культивирование дрожжей *End.fibuliger R-3I3* поверхностным методом

Выращивание дрожжей *End.fibuliger R-3I3* поверхностным методом провели на Тукумском ферментном заводе кюветным способом в заводской растильной камере при температуре 30°C. В качестве основной питательной среды использовали пшеничные отруби без и с добавлением солодовых ростков. Отруби увлажняли питательной средой, которую использовали в некоторых опытах для глубинного культивирования *End.fibuliger R-3I3*. Следующие партии увлажняли той же средой, из которой постепенно исключали по одному или нескольким компонентам. Исследовалось также влияние разной влажности на образование амилолитических ферментов.

Полученные данные показали, что при поверхностном культивировании на амилолитическую активность не влияет добавление к пшеничным отрубям дополнительных минеральных солей и биостимуляторов в виде дрожжевого автолизата и вытяжки из солодовых ростков.

Однако синтез декстриназы незначительно, а синтез глюкоамилазы в значительной мере зависит от биостимуляторов - дрожжевого автолизата и вытяжки из солодовых ростков. Это свидетельствует о том, что пшеничные отруби содержат достаточное количество минеральных солей, но недостаточно биостимуляторов для синтеза глюкоамилазы данной культурой.

Лучший синтез всех амилолитических ферментов, амилазы, декстриназы, глюкоамилазы имеет место при начальной влажности отрубей 65,6%.

### 9. Получение технического ферментного препарата с глюкоамилазной активностью

Культуральную жидкость получали выращиванием дрожжей *End.fibuliger R3I3* в 100 л заводских ферментерах на подобранной методом математического планирования экспери-

мента производственной среде с кукурузной мукой или растворимым крахмалом и кукурузным экстрактом, минеральными солями.

Полученную культуральную жидкость сгущали в вакуум-выпарных аппаратах "Simax" при температуре 25°-30°C. При выпаривании потери глюкоамилазной активности составляли 1,0-3,5%.

Разработку режима сушки провели во взвешенном состоянии в лабораторной сушилке с носителем. Принимая во внимание термолабильность глюкоамилазы культуральной жидкости *End.fibuliger R-3I3* в первой серии опытов сушку провели при температуре входящего в сушилку воздуха 40° и выходящего - 34°C. В качестве наполнителя использовали 8% солодовых ростков добавляемых к культуральной жидкости. Потери ферментативной активности при сушке с наполнителем составляли 2%±16%, глюкоамилазная активность сухого препарата составляла 935 ед на г сухого вещества.

В следующей серии опытов сушку провели без наполнителя. Для уточнения температуры сушки сгущенную культуральную жидкость сушили при температуре входящего в сушилку воздуха 40-70°C и исследовали изменение глюкоамилазной активности в зависимости от температуры сушки. С повышением температуры входящего в сушилку воздуха выше 45°C резко уменьшается глюкоамилазная активность. При сушке без наполнителя глюкоамилазная активность в сухом препарате составляет 1500 ед на г сухого вещества.

Из эксперимента было видно, что термическая обработка культуральной жидкости при повышенных температурах сильно влияет на ее глюкоамилазную активность.

При лиофильной сушке потери глюкоамилазной активности не превышают 4%, но это является слишком дорогим методом сушки.

Согласно данным нашего эксперимента в сушилке с носителем (общий объем диффузора 0,004553 м<sup>3</sup>) для высушивания 30 г воды из сгущенной культуральной жидкости потребовалось

$\tau=10$  часов, при этом получено 6 г технического ферментного препарата.

Таким образом объемное напряжение сушилки очень низкое и составляет всего лишь  $0,659 \text{ кг/м}^3 \text{ час}$ , и использовать упомянутую сушилку для сушки глюкоамилазы очень неэффективно.

Потери глюкоамилазной активности в большой степени зависят от температуры хранения ферментного препарата. При температуре хранения ферментного препарата  $+7^\circ$  в течение одного года потери глюкоамилазной активности не превышают 10%, но при температуре хранения  $+20^\circ$  потери составляют 45%.

При хранении ферментного препарата при температуре  $+20^\circ$ , полученного поверхностным способом культивирования дрожжей *End.fibuliger R-3I3*, в течение 1,5 года потери глюкоамилазной активности составляют 35%.

В дальнейшем было показано, что препарат технического назначения можно получить путем упаривания культуральной жидкости в вакуумвыпарных аппаратах до содержания сухих веществ 20% и путем консервации раствора добавлением бензойной кислоты. Бензойную кислоту добавляли к культуральной жидкости 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,6% и сохраняли при температуре  $+20^\circ$  и  $+7^\circ\text{C}$ .

Опыты показали, что потери глюкоамилазной активности в сгущенной культуральной жидкости при хранении в течение трех месяцев при температуре  $+7^\circ$  составляют 8,2%, а при  $+20^\circ$  - 50,8%.

Резюмируя полученные данные относительно оптимальных вариантов использования дрожжей *End.fibuliger R-3I3* в народном хозяйстве, можно рекомендовать для использования в микробиологической промышленности, там, где это возможно, непосредственно культуральную жидкость, оборудуя на месте культиваторы непрерывного действия. Для транспортирования на другие места использования целесообразно получать упаренный и консервированный сиропобразный концентрат.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Методом последовательной адаптации от музейной культуры выделен штамм *End.fibuliger R-3I3*, обладающий амилолитической активностью и большой скоростью роста в крахмалсодержащих средах.

2. Методом математического планирования подобрана полусинтетическая среда, которая способствует росту дрожжей *End.fibuliger R-3I3* и биосинтез амилолитических ферментов, следующего состава (в %): растворимый крахмал -0,8; кукурузный экстракт -1,5; кашалотовый жир -0,5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  -0,25;  $\text{CaCl}_2$  -0,04;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  -0,22. В производственных средах растворимый крахмал и часть кукурузного экстракта могут быть заменены на кукурузную муку.

3. Доказан индуцированный характер амилолитических ферментов дрожжей *End.fibuliger R-3I3*, поэтому в качестве источника углерода может быть использован крахмал и продукты его неполного гидролиза. Этиловый спирт увеличивает накопление биомассы, но полностью угнетает синтез амилазы и частично глюкоамилазы.

4. Лучшим источником азота для синтеза амилолитических ферментов дрожжей *End.fibuliger R-3I3* является сернокислый аммоний. Для накопления биомассы культура в одинаковой мере использует азот солей  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Минеральные компоненты  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , входящие в состав модифицированной синтетической среды Ридер не являются обязательным компонентом для образования клеточной биомассы *End.fibuliger R-3I3* и синтеза амилолитических ферментов.

5. Лучшим источником биологически активных веществ при биосинтезе глюкоамилазы и образовании биомассы у *End.fibuliger R-3I3* является кукурузный экстракт. Установлено, что кашалотовый жир добавленный к среде в количестве 10-20% способствует увеличению глюкоамилазной активности 2 раза и интенсифицирует накопление биомассы.

6. Оптимальное значение pH среды для образования глюкоамилазы и биомассы составляет 7,0 для образования амилазы 5,5÷6,5. Оптимальное действие глюкоамилазы культуральной жидкости *End.fibuliger R-3I3* наблюдается при pH 5,0 и температуре 39°C.

7. Максимальный ростовой эффект и накопление всех ферментов системы амилаз обеспечивает интенсивность аэрации 122 мг O<sub>2</sub>/л мин и температура - 32°C.

8. Показано что дрожжи *Endomycopsis* развиваются и синтезируют амилолитические ферменты в проточных условиях культивирования. В гомогенном процессе в хемостате динамическое равновесие системы устанавливается при  $0,1 \leq D \leq 0,27$ .

9. В условиях непрерывного процесса культивирования *End.fibuliger R-3I3* удельная скорость роста увеличивается на 70% по сравнению с периодическим процессом; продуктивность системы по образованию биомассы в 17 раз, по биосинтезу фермента глюкоамилазы в 6 раз выше, а максимальная биосинтетическая активность культуры увеличивается с 0,589 ед/г час до 5,700 ед/г час.

10. Биомасса дрожжей *End.fibuliger R-3I3*, полученная на крахмалсодержащих средах в проточных условиях культивирования при  $0,1 \leq D \leq 0,27$  и продуктивности системы  $D \cdot X = 5,67$  г/л час содержит до 45% условного белка.

11. Разработаны технологические режимы получения сухого ферментного препарата кормового назначения, содержащего биомассу продуцента и остатки питательной среды, глубинным и поверхностным методом культивирования.

12. Установлена величина потерь активности фермента глюкоамилазы при термической обработке и во время хранения культуральной жидкости, а также упаренного и высушенного препаратов. Потери активности при вакуумной выпарке при 25-30°C не превышают 4%, при сушке в зависимости от метода, потери активности составляют 7-30%. Во время хранения сухих препаратов в течение года при температуре +7°C потери составляют около 10%, а при + 20°C около 20-30%.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах соискателя:

1. М.Е.Бекер, Ю.О.Якобсон, Р.Я.Карклиньш, Э.А.Линде, Г.К.Лиепиньш, А.Я.Клинцаре, А.А.Клинцаре, Д.Я.Креслия, М.А.Дреймане. Стимулирующее действие некоторых экстрактов растительного и микробного происхождения на рост и активность микроорганизмов. Материалы конференции Прибалтийских республик по вопросам стимулирования растений, животных и микроорганизмов, Вильнюс, 1969.
2. М.Е.Бекер, М.А.Дреймане. Амилолитическая активность дрожжей *Endomycopsis fibuliger R-3I3*. Тезисы 2-ого Всесоюзного биохимического съезда, Ташкент, 1969.
3. М.А.Дреймане. Дрожжи с амилолитической активностью. Известия АН Латвийской ССР, № 12, 1969.
4. М.А.Дреймане. Влияние некоторых химических факторов на биосинтез гидролитических ферментов дрожжами *Endomycopsis fibuliger R-3I3*. Материалы IV биохимической конференции Прибалтийских республик, г.Вильнюс, 1970.
5. М.Е.Бекер, М.А.Дреймане, Л.П.Аузиня, А.К.Седвалдс, У.Э.Виестур, К.А.Калунянци, Л.И.Орещенко, Н.П.Черняев, В.Н.Гейзе, А.И.Валдман. Способ получения ферментного препарата с глюкоамилазной активностью путем микробиологического синтеза. Решение о выдаче авторского свидетельства по заявке №144362/28-13. 1971.
6. М.Е.Бекер, М.А.Дреймане, У.Э.Виестур, А.Я.Озолс, И.Я.Краузе, А.Ф.Апсите, А.О.Вецозола, К.А.Калунянци. Способ получения ферментного препарата глюкоамилазы. Решение о выдаче авторского свидетельства по заявке № 1632633/28-13. 1972.

Результаты исследований доложены на Юбилейной научной конференции Общественного научно-исследовательского института Республиканского правления научно-технического общества пищевой промышленности в ноябре 1969г.(Рига), на конференции Прибалтийских республик по вопросам стимулирования растений, животных и микроорганизмов в июне 1969г.(Вильнюс), на IV Биохимической конференции Прибалтийских республик в ноябре 1970г.(Вильнюс).