

БИОЛОГИЯ. ЭКОЛОГИЯ. СЕЛЬСКОЕ ХОЗЯЙСТВО

Доолоткельдиева Т.Д., Исакова Ж., Тотубаева Н.Э., Бобушова С.Т.

**СПОСОБЫ ГЛУБИННОГО И ПОВЕРХНОСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ШТАММОВ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКЦИИ
ФЕРМЕНТА - АМИЛАЗЫ**

Doolotkeldieva T.D., Isakova Z., Totubaeva N.E., Bobushova S.T.

**SUBMERGED AND SOLID CULTIVATION OF FUNGI FOR INCREASING OF
AMYLASE PRODUCTION**

УДК: 576.8

Для получения биомассы фермента амилазы в опыте были использованы два штамма из нашей лабораторной коллекции: Aspergillus nidulans, штамм 5Н-3-12, и Penicillium lividum, штамм Ш-4 ком. Культивирование штаммов проводили двумя способами: глубинное культивирование в жидкой среде и на поверхности плотной питательной среды. Были изучены факторы, определяющие максимального выхода биомассы фермента: состав питательных веществ (соотношение источников углерода и азота), длительность фаз развития и роста микроорганизмов, скорость процесса деления, увеличение биомассы, pH среды и температура.

The two strains from our laboratory collection: Aspergillus nidulans, strain 5H-3-12, and Penicillium lividum, strain Sh-com-4 were used for a biomass production of amylase.

The cultivation was carried out in two ways: submerged cultivation in the liquid medium and solid fermentation. The factors determining of the maximal production of enzyme biomass have been investigated: structure of nutrients (a ratio of carbon and nitrogen sources), duration of growth phases of microorganisms, speed of division process, biomass increase, medium pH, temperature and others.

В настоящее время ферментные препараты применяются более чем в 20 отраслях пищевой, легкой и медицинской промышленности. Так их используют в хлебопечении и пивоварении, виноделии, кондитерской, молочной, спиртовой, крахмально-паточной и безалкогольной промышленности, в производстве мяса и мясопродуктов, консервов, изделий фруктов и овощей. Большое значение имеет применение ферментных препаратов в легкой промышленности (текстильной, кожевенной и бумажной), фото и кинопромышленности.

Одним из основных источников получения амилолитических, целлюлолитических и пектолитических ферментов являются микромицеты, способные продуцировать широкий спектр активных внеклеточных амилаз, пектиназ и целлюлаз. При подборе продуцента гидро-

литических ферментов исходят из интенсивности его роста в культуре, экскреторной активности и спектра экскретируемых ферментов. Продуцентами гидролитических ферментов, которые удовлетворяют этим требованиям, являются микроскопические грибы рода Aspergillus, Penicillium, Cladosporium и Trichoderma. [1,2].

Aspergillus niger является вторым источником ферментов каталазы. Каталаза используется в пищевой промышленности для удаления перекиси водорода, который используется для стерилизации или обесцвечивания ферментационной среды, имеет большой экономический интерес для стран, выращивающих пальмовые культуры [6]. Получен мутантный штамм Aspergillus phoenicis, в 6 раз увеличивающий продукции внеклеточной каталазы, чем дикий вариант [7].

Состав используемой культуральной питательной среды является фактором, оказывающим огромное влияние на клеточный метаболизм. Особенность многих микробных культур состоит в двухфазности их развития. Часто образование ферментов значительно запаздывает, а иногда максимальная скорость синтеза ферментов наблюдается в фазе замедления роста культуры или его прекращения [3,4,5].

Целью настоящих исследований являлась оптимизация условий глубинного и поверхностного культивирования штаммов микромицетов для повышения продуктивности фермента амилазы, установление физико-химических параметров активности биомассы фермента.

Материал и методы исследований

Для получения биомассы фермента амилазы в опыте были использованы два штамма из нашей лабораторной коллекции: 5Н-3-12, Aspergillus nidulans [Eidam, 1884] и Ш-4-ком, Penicillium lividum [Wesling, 1911], которые активно секретируют амилазу.

Культивирование выше указанных штаммов проводили двумя способами: глубинное культивирование в жидкой среде и на поверхности плотной питательной среды. Были изучены факторы, определяющие максимального выхода биомассы получаемого продукта – фермента. Основные из них – состав питательных веществ (соотношение источников углерода и азота), удовлетворение их соотношений физиологическим особенностям микроорганизмов, а также длительность фаз развития и роста микроорганизмов, скорость процесса деления, увеличение биомассы, pH среды, температура и другие. Для изучения этих факторов через каждое определенное время измеряли pH, сухую биомассу, оптическую плотность и количество жизнеспособных клеток растущей культуры.

Для поддержания культур микромицетов использовали агаризованную среду Чапека и декстрозно-картофельный агар (pH-5,6).

При глубинном культивировании были использованы различные составы питательных сред: среда Чапека без агара; среда с пшеничными отрубями – пшеничные отруби – 0,5 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5 %, KH_2PO_4 – 0,1 %, MgSO_4 – 0,1%, pH- 4,0; среда Сусло – сусло- 0,5 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5 %, KH_2PO_4 – 0,1 %, MgSO_4 – 0,1 %, pH-5,0.

Культуры штаммов выращивали в колбе Эрленмейера объемом 250 мл в жидкой питательной среде объемом 50 мл при постоянном встряхивании (250 об/мин) при температуре 29,80С в течение 48 часов.

В качестве посевного материала использовали водную суспензию спор грибов (в количестве 0,1 % от общего объема среды), выращенных на среде Чапека при 24° С в течение 5 суток, исходное pH среды 4,8-5. Эксперименты были выполнены в 2-х повторностях. Измеряли следующие показатели: подсчет КОЕ (колония образующие единицы), pH среды и объем биомассы. Для подсчета КОЕ проводили посев глубинным методом на твердой питательной среде Чапека, через определенный промежуток времени: 6, 12, 24, 32, 48 и 72ч. Через эти же интервалы измеряли pH среды pH метром марки Accumet AB15 + bench-top meter. При определении биомассы, полученную массу фильтровали через бумажный фильтр на воронке Бюхнера и мицелий промывали дистиллированной водой и высушивали при 100°С до постоянного веса. Количество биомассы выражали в граммах на 1 л культуральной жидкости. Определение биомассы проводили по оптической плотности по показанию спектрофотометра (Genesis TM 10 Series Spectrophotometers, Thermo Electron Corporation), при этом использовали

культуральную жидкость в количестве 1мл через определенный интервал времени.

Биомассу продуцента отделяли от питательной среды путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин, затем промывали водой и снова центрифугировали в тех же условиях. Готовую биомассу продуцента сушили при 25-27 0С. Для выделения фермента биомассу экстрагировали ацетатным буфером, pH 4,7 (1,5-2 ч при 20-220С и перемешивании), центрифугировали (35 мин при 3000об/мин) и супернатанту подвергали дальнейшей обработке. Фермент осаждали 80%-ным изопропиловым спиртом в соотношении 1:4 и центрифугировали при 3000об/мин в течение 15 мин. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме ацетатного буфера (pH 4,7).

Культивирование на твердой питательной среде.

При подготовке твердой питательной среды основное внимание было уделено использованию дешевых источников питания. Так как это приводит к снижению себестоимости конечного продукта при производстве ферментных препаратов. В наших исследованиях в качестве дешевых источников углерода использовались растительные отходы, в частности кожура картофеля.

Культуры выращивали на поверхности измельченной кожуры картофеля с добавлением минерального раствора (0,1 % NH_4NO_3 , 0,1% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) при температуре 300С в течение 14 суток. Через каждые 48 ч из культивируемого мицелия готовилась экстракция, и определяли наличия или отсутствия ферментативной активности супернатанта, а также отдельно измеряли наличие ферментативной активности осадка.

Об амилолитической активности судили по степени расщепления крахмала до декстринов, не окрашивающихся йодом. Единица активности выражается количеством крахмала (г), который расщепляется до декстринов за 1 ч при 40 и 500 при применении для гидролиза 1г ферментного препарата.

Результаты и обсуждение

1. Физико-химические показатели культивирования микромицетов.

Из трех использованных сред наиболее отличительные результаты были получены, когда для культивирования микромицетов была использована среда, содержащая пшеничные отруби, минеральные соли азота, фосфора и серы. Поэтому в данной работе мы будем обсуждать полученные результаты при глубинном культивировании штаммов на этой среде.

1.2. Показатели pH среды.

Значение pH среды определяли через 6, 12, 24, 36 и 48 часов культивирования. Как видно из рис.1. значения pH среды у обоих штаммов уже после 6 ч культивирования в 1,5 и 2 раза увеличивались по сравнению первоначальным данным. Следовательно, это указывает на то, что в этом промежутке времени клетки микромицетов проходят лаг – фазу или фазу адаптации и начинают интенсивно потреблять питательные вещества, выделяя в среду продукты обмена веществ, тем самым происходят изменения первоначальных значений pH. На 36 часовом промежутке культивирования значение pH среды резко изменилось в сторону кислотности. Можно полагать, что рост и развитие клеток, проходившие в этом промежутке времени способствовали интенсивное выделение метаболитов типа

кислотных соединений, что привело к изменению pH среды в кислую сторону.

А измерения, произведенные, через 48 ч показали, что показатели pH среды у обоих штаммов колебались в сторону щелочных значений.

1.2. Показатели по определению сухой массы клеток микромицетов в культивируемой питательной среде.

Определение сухой массы в период роста позволяет определить темп процесса деления, увеличения или снижения количества клеток в популяции. Как видно из рис.2 при 48 часовом культивировании у обоих исследуемых штаммов (5Н-3-12 и Ш-4-ком) произошло значительное накопление сухого вещества по мере прохождения времени от начало опыта.

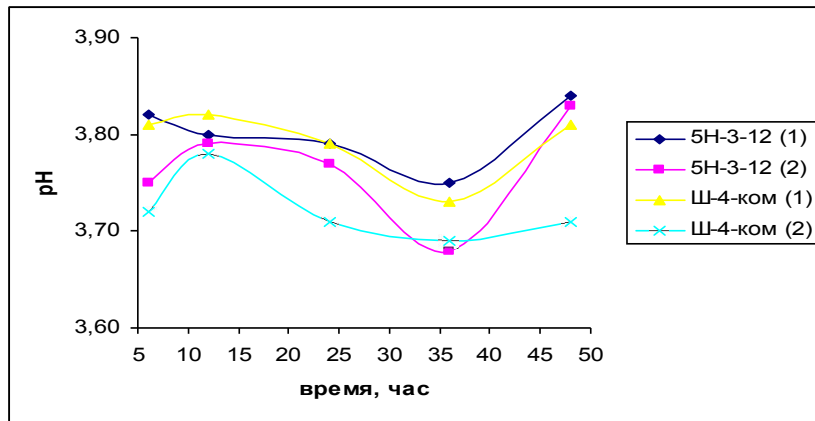


Рис.1. Значение Рн среды при глубинном культивировании культур микромицетов в жидкой среде

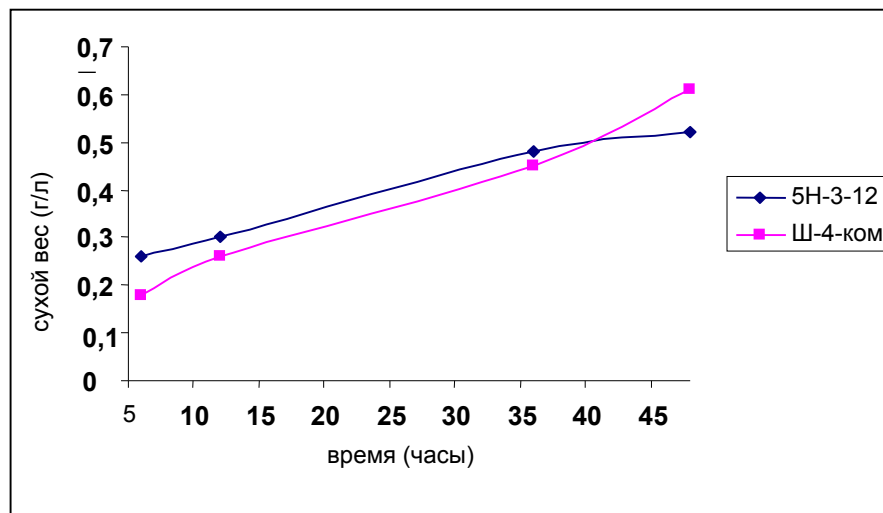


Рис.2. Показатели сухой массы получаемой продукции за исследуемый период времени

Вес сухой массы штамма Ш-4-ком через 48ч роста был выше, чем массы штамма 5Н-3-12. Например, если окончательный вес сухой массы штамма Ш-4-ком составила 0,6 г/л, то вес сухой массы штамма 5Н-3-12 составил 0,5 г/л.

Несмотря на то, что прирост сухой массы в промежутке 6 и 10ч культивирования не составил существенных величин, однако резкое его увеличение произошло в последующие промежутки времени. Следовательно, состав питательной среды используемой для выращивания микроорганизмов отвечает физиологическим потребностям культур микромицетов. За 48 часов культивирования произошло интенсивное деление, увеличилось количество клеток в популяции. В итоге увеличилась масса и объем всей популяции. Это доказывает об эффективности усвоения клетками микромицетов питательные вещества, содержащиеся в используемой среде.

2.3. Определение количества клеток культивируемой культуры в жидкой питательной среде.

Для определения количества жизнеспособных клеток в жидкой питательной среде производили подсчет колониобразующих единиц (КОЕ) микромицетов. При выращивании в жидкой питательной среде содержащей пшеничные отруби, при первоначальном значении pH- 4,8, рост клеток штаммов 5Н-3-12 и Ш-4-ком был отмечен через 6 ч инкубации. Следовательно, до 6 ч происходила адаптация микроорганизмов к условиям среды, т.е. они находились в лаг-фазе. После 6 ч роста процесс деления клеток активизировался, и среднее число клеток в 1 мл суспензии составило 248000 кл/мл. Среднее количество клеток штамма Ш-4-ком в этом отрезке времени было немного ниже, и составила 18000 кл/мл. После 12ч роста наблюдалось возрастание числа клеток, что означает повышение скорости деления клеток. Наблюдалось дальнейшее возрастание числа КОЕ до 36 часов культивирования. Следовательно, в исследованных промежутках времени от 24 ч до 36 ч клетки переживают нахождения в экспоненциальной фазе. После 48 ч произошло снижение количества клеток. При интенсивном росте клеток накапливаются продукты обмена веществ и токсические метаболиты губительно действуют на жизнеспособность клеток, вследствие этого начинается процесс отмирания часть популяции и переход к стационарной фазе. Следует отметить, что количество клеток штамма 5Н-3-12 в выращиваемой среде было высоким. Следовательно, имеющие в составе данной питательной среды баланс химических элементов и соединений, используемых в качестве источника азота и углерода наиболее полно соответствует физиологическим требованиям клеток штамма 5Н-3-12, по сравнению с штаммом Ш-4-ком (рис.4,5). Однако отмечено относительное сходство времени по фазам размножения и развития. Таким образом, в жидкой питательной среде посредством подсчета клеток культивируемой культуры, можно определить, в какое время какая фаза роста начинается и когда заканчивается.

2.4. Определение оптической плотности биомассы питательной среды при поверхностном культивировании на твердой среде

Многие молекулы поглощают свет видимый в спектре или в области ультрафиолета. Это свойство можно использовать при определении концентрации веществ. Величина поглощения зависит от происхождения веществ и концентрации, а также от длины используемой световой волны. Оптическая плотность была определена при помощи спектрофотометра через 6, 12, 24, 36 и 48 часов; 4,6,8 и 14 суток с использованием 280 nm, 540 nm, 900 nm, 1100 nm длины волны.

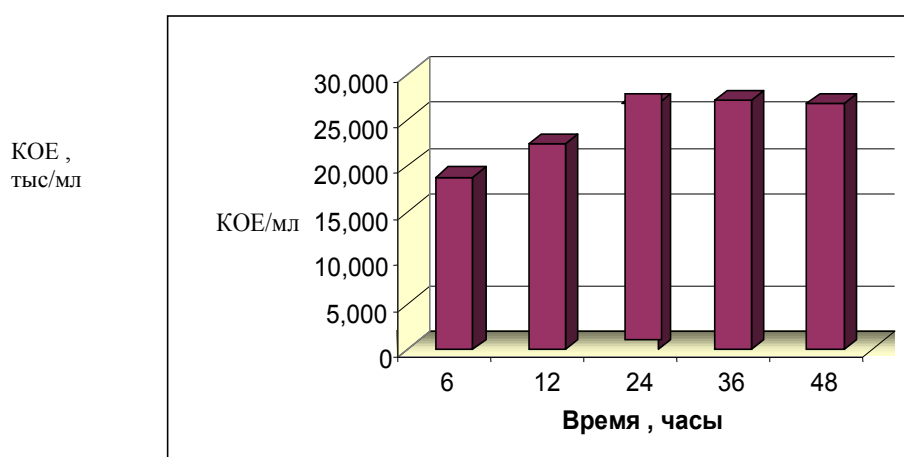


Рис.4. Колониобразующие единицы (КОЕ) штамма Ш-4-ком (*Penicillium lividum*).

Как видно из рис 6, в промежутке времени до 2 суток при 540 nm длины волны величина поглощения лучей биомассой составила 0,057 А, а в промежутке между 4 и 6 суток величина поглощения увеличилась, что означает увеличение плотности биомассы. На 8-сутки выход полученной биомассы достиг высокого уровня, что при 740 nm и 900 nm длины световой волны не было отмечено поглощения волны. Поэтому плотность была определена при 1100 nm длины световой волны. Через 14 суток использования этих же волн дали низкие показатели. На 8-сутки по сравнению с другими сутками был отмечен самый высокий пик выделения культурами биомассы метаболитов.

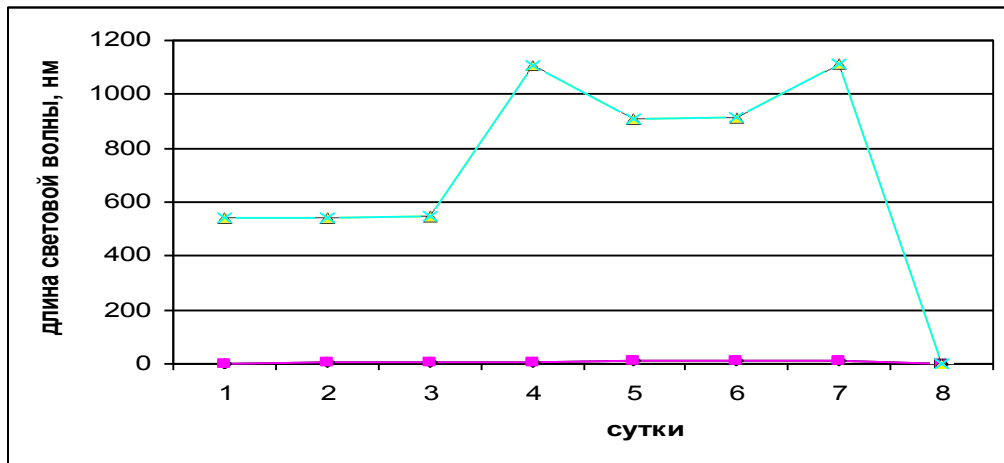


Рис 6. Показатели поглощения биомассы фермента длины световых волн (нм) на различные сутки культивирования.

2.5. Определение оптимальной температуры проявления амилолитической активности биомассы фермента , полученного при глубинном культивировании

3.1.Амилолитическая активность биомассы супернатанта

Тест определение оптимальной температуры активности фермента амилазы проводился при 25°C, 30°C, 40°C и 60°C. Как видно на рис.7 при 25°C исследуемые оба штамма не проявили амилолитической активности в течение 80 мин. Колонии культивированные на среде содержащей крахмал, при участии йода не образовали зоны обесцвечивания. Следовательно, фермент, выделяемый микромицетом, не проявляет свою активность при 25°C. При температуре 30°C после 50 мин культура Ш-4-ком проявила амилолитическую активность, зона обесцвечивания составила 3,8± 1,7 мм, амилолитическая же активность штамма 5-Н-3-12 за 70 мин составила всего 1,5± 0,7 мм (рис.8) .

При температуре 40°C уже после 10 мин исследуемые штаммы начали проявлять амилолитическую активность. Активность обоих штаммов после 10 мин была одинаковой, обесцвечивающая зона составила 1,0 ± 0,2 мм. После 20 мин активность штаммов еще больше активизировалась. В промежутке между 30 мин и 40 мин активность еще возросла. Активность штамма Ш-4-ком была выше на 1,5 раз по сравнению с другим исследуемым штаммом. Например, если зона расщепления крахмала после 30 мин штамма Ш-4-ком составила 6,0 ± 0,2 мм, то зона обесцвечивания культуры 5-Н-3-12 составила 3,7 ± 0,5мм. После 50 мин активность исследуемых штаммов достигла максимального уровня, после чего они остались без изменения. В этот промежуток времени зона лизирования крахмала культурой Ш-4-ком составила 8,0 ± 0,3 мм. А активность штамма 5-Н-3-12 составила 5,0 ± 0,2 мм.

Таким образом, при температуре 40°C в течение 50 мин ферментативная активность исследуемых культур достигла максимального уровня. После этого времени до 80 мин активность штаммов оставалась неизменной (рис.9).

При температуре 50°C самая высокая ферментативная активность отмечена через 40 мин, ферментативная активность здесь проявилась на 10 мин раньше, по сравнению с 40°C температурным режимом. Через 40 мин. зона гидролиза крахмала культурой Ш-4-ком была равна 8,0 ± 0,3 мм, а активность штамма 5-Н-3-12 составила 6,0 ± 0,2 мм, что выше на 1 величину по сравнению с температурой 40°C. При температуре 50°C до 80 мин активность также осталась неизменной (рис.10).

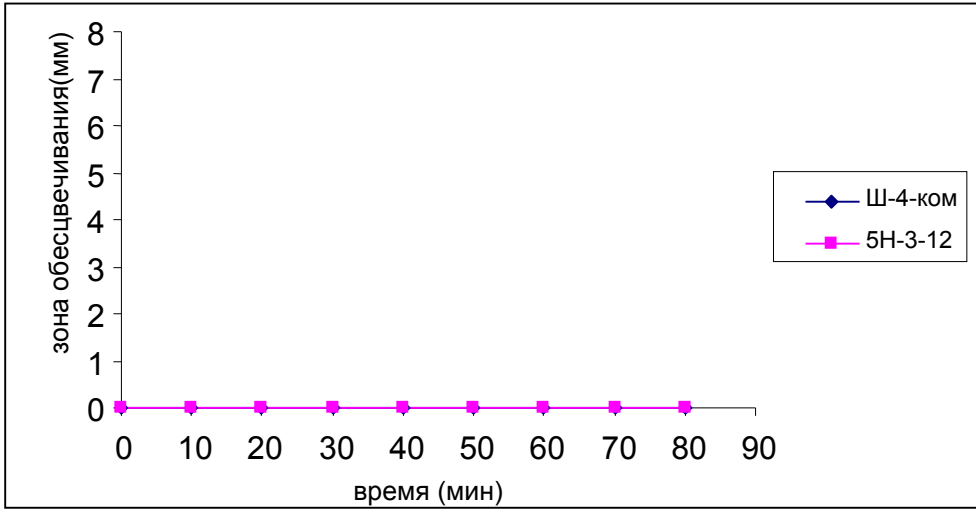


Рис.7.Проявление амилолитической активности штаммов при 25⁰С.

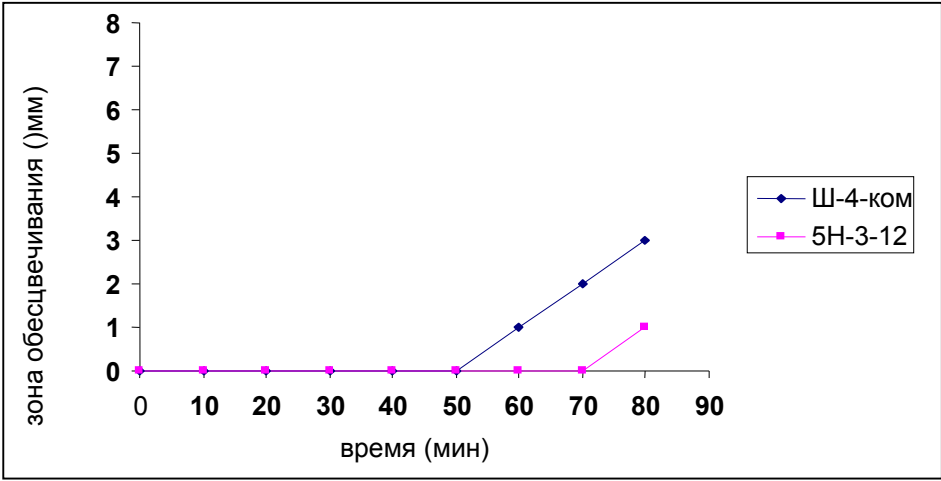


Рис.8. Проявление амилолитической активности штаммов при 30⁰С.

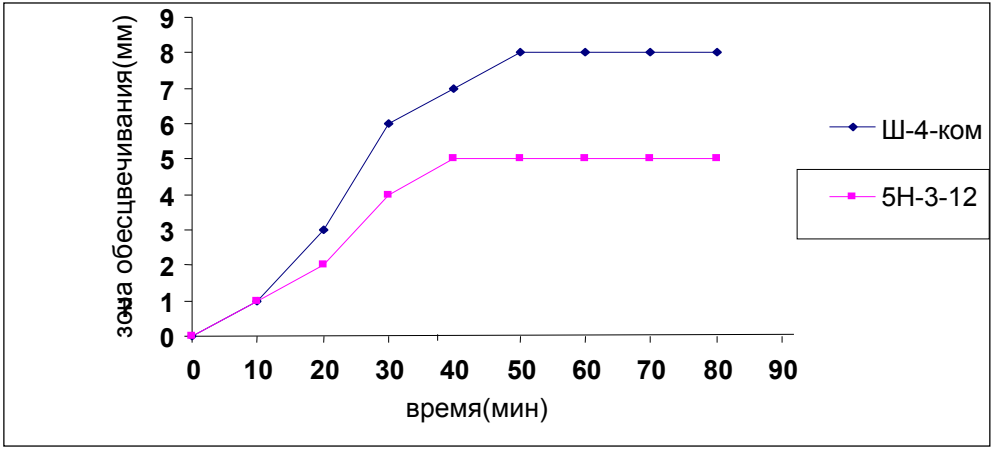


Рис.9.Проявление амилолитической активности штаммов при 40⁰С.

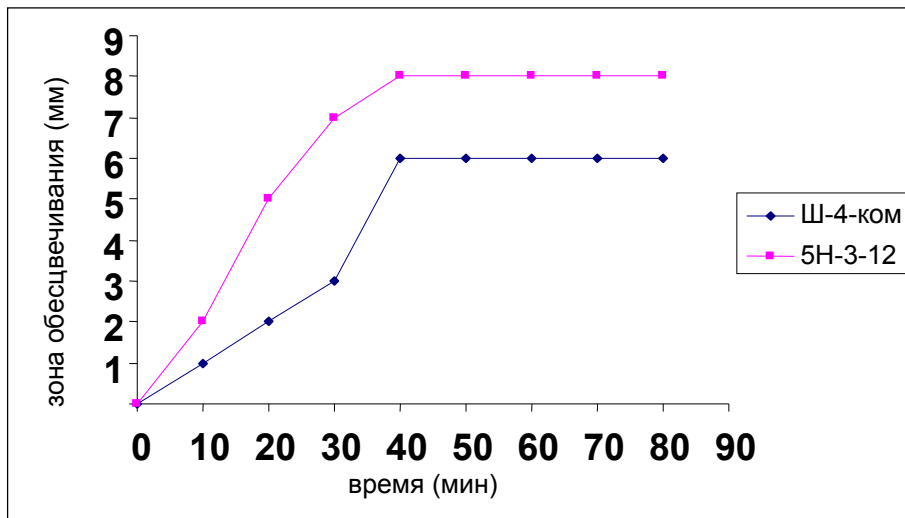


Рис.10. Проявление амилолитической активности штаммов при 50 °С.

Как показали исследования, ферментативная активность супернанта при температуре 60°С была низкой. Его активность достигла своего максимума через 30мин, далее осталась неизменной. Однако показатели активности были ниже на несколько величин по сравнению с температурой 40°С и 50°С. Необходимо отметить, что при данной температуре активность штамма 5-Н-3-12 ($4,1 \pm 1,2$ мм) была выше активности штамма Ш-4-ком ($2,9 \pm 1,1$ мм) (рис.11).

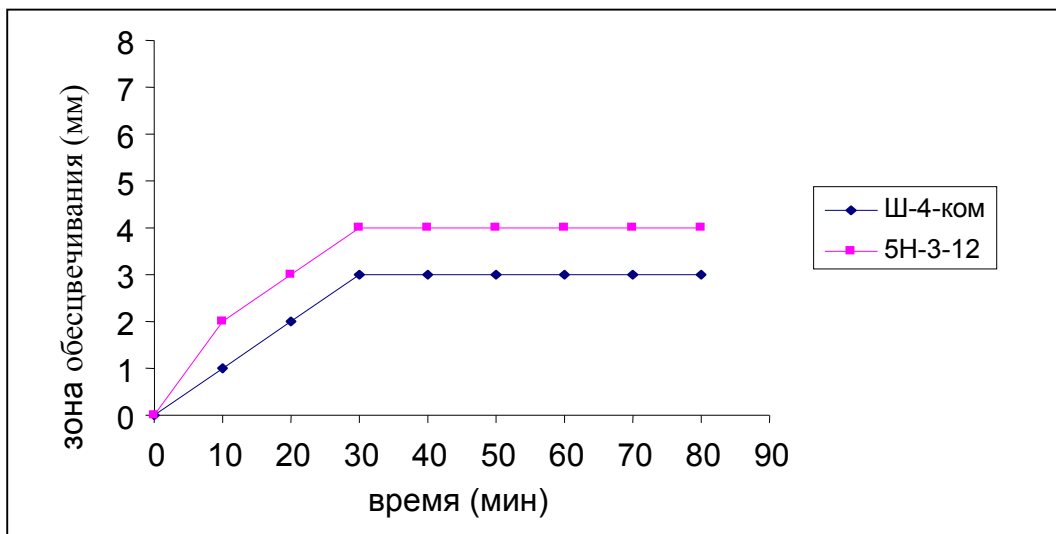


Рис. 11. Проявление амилолитической активности штаммов при 60 °С.

Следовательно, оптимальной температурой для проявления ферментативной активности штамма 5-Н-3-12 является 50°С (рис. 12). При данной температуре ферментативная активность данного штамма была высокой и проявилась в относительно короткое время.

А для штамма Ш-4-ком оптимальной температурой для проявления ферментативной активности оказалась 40°С. При данной температуре ферментативная активность штамма достигла высокого уровня и проявилась через 50 мин (рис. 13).

Таким образом, как показали проведенные опыты, амилолитическая активность штамма 5-Н-3-12 была выше в несколько раз по сравнению со штаммом Ш-4-ком. Например, если зона обесцвечивания 5-суточной культуры 5-Н-3-12 составила 5,0 мм, то при данной температуре штамм Ш-4-ком не проявил своей активности.

3. 2. Амилолитическая активность биомассы осадка.

Амилолитическую активность биомассы осадка наблюдали в течение 31 суток при разном температурном режиме – 25 °С, 30 °С, 40 °С, 50 °С и 60 °С. Была выявлена разница по амилолитической активности биомассы осадка у двух исследуемых штаммов. По итогам исследований выявлено, что амилолитическая активность биомассы осадка штамма Ш-4-ком была сильнее по сравнению с активностью штамма 5-Н-3-12. Результаты полученные в течение 7 суток, при температуре 50 °С показаны на рис. 14.

Амилолитическая активность штамма Ш-4-ком в среде содержащей крахмал на 1-2 сутки проявилась образованием зоны обесцвечивания в размере $8,0 \pm 0,4$ мм. Активность же штамма 5-Н-3-12 в этот промежуток времени была несколько ниже.

Полученные результаты показали, что амилолитическая активность супернанта у штамма 5-Н-3-12 была высокой по сравнению с осадком, тогда как, а у штамма Ш-4-ком амилолитическая активность осадка была высокой, чем у супернанта.

Следовательно, можно прийти к выводу о том, что штамм 5-Н-3-12 выделяет фермент из клетки в окружающую среду, и входит в ряд гидролитических экзоферментов, тогда как штамм Ш-4-ком содержит фермент в своем мицелии.

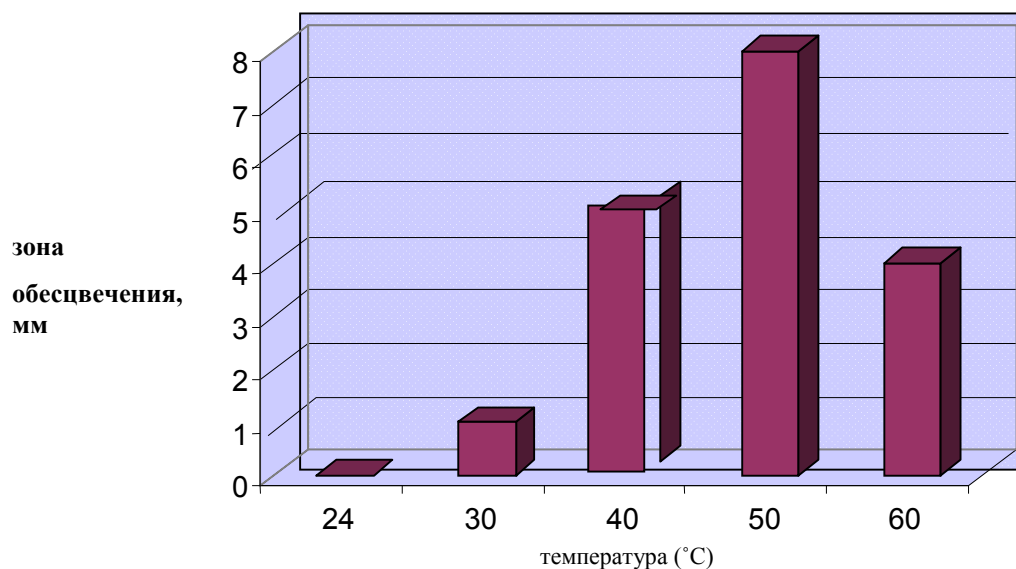


Рис.12. Амилолитическая активность штамма 5Н-3-12 при разных температурных режимах.

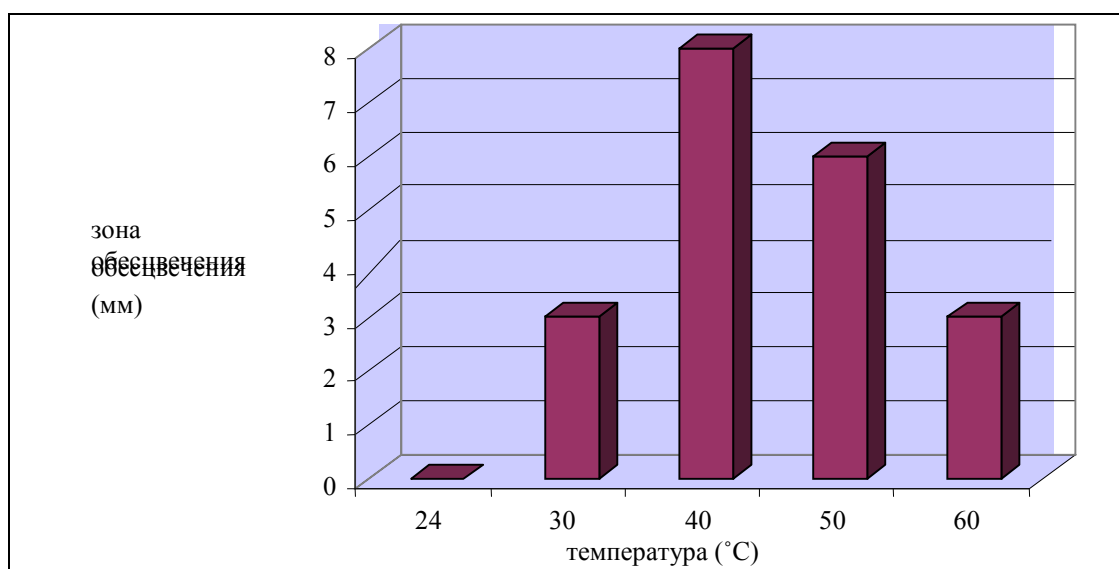


Рис.13. Амилолитическая активность штамма Ш –4 ком при разных температурных режимах.

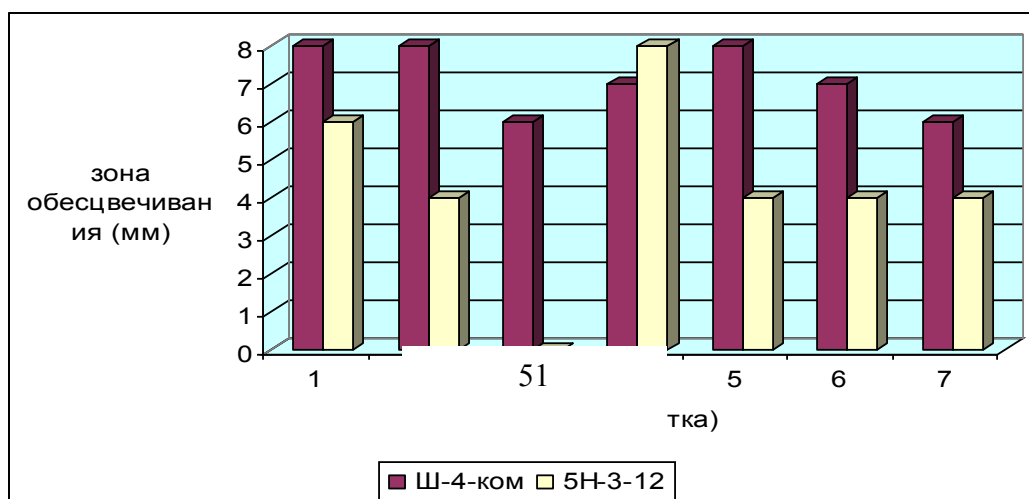


Рис.14. Амилолитическая активность биомассы осадка штаммов при 50 °С температуре.

4. Определение оптимальной температуры проявления амилолитической активности биомассы фермента, полученного при глубинном культивировании

При подготовке твердой питательной среды основное внимание было уделено использованию дешевых источников питания. Так как это приводит к снижению себестоимости конечного продукта при производстве ферментных препаратов. В наших исследованиях в качестве дешевых источников углерода использовались растительные остатки, в частности кожура картофеля.

Культуры выращивали на поверхности измельченной кожуры картофеля с добавлением минерального раствора при температуре 30°С в течение 14 суток. Через каждые 48 ч из культивируемого мицелия готовилась экстракция, и проводились исследования о наличии или отсутствии ферментативной активности супернатанта и осадка в отдельности. Исследования были направлены на определение времени проявления ферментативной активности выращенных на данном субстрате культур, и продолжительности сохранения свою активность полученной биомассы.

4.1. Амилолитическая активность выделенного супернатанта.

При определении амилолитической активности были использованы оптимальные температурные режимы, которые были установлены в предыдущих опытах, так активность штамма 5-Н-3-12 определяли при температуре 50 °С, а активность штамма Ш-4-ком при температуре 40 °С.

Супернатанту выдерживали в термостате за 1 час при оптимальной температуре для культур. После этого в предварительно подготовленных чашках Петри со средой содержащей 20% крахмал, проделали отверстия и вливали туда 1мл супернант и инкубировали в термостате в течение 1 ч при 50 °С и 40 °С температурах.

После истечения 1 ч вокруг зоны супернатанта наносили раствор Люголя и проверяли амилолитическую активность. Как показали проведенные исследования, после 48 часов культивирования зона обесцвечения штамма Ш-4-ком достигла $6,0 \pm 1,2$ мм, сравнительно опередив показания штамма 5-Н-3-12 ($4,0 \pm 0,2$ мм). Однако, после 96 ч, ферментативная активность штамма Ш-4-ком снизилась и составила $4,0 \pm 0,2$ мм. А активность штамма 5-Н-3-12 увеличилась на одну величину. На 8 сутки исследования оба штамма достигли высокой ферментативной активности. Самая максимальная зона обесцвечения штамма 5-Н-3-12 составила $9,0 \pm 2,2$ мм, а штамма Ш-4-ком $6,7 \pm 1,3$ мм. Ферментативная активность обоих штаммов проявилась до 14 суток.

3.6. Наблюдение за ES комплексом.

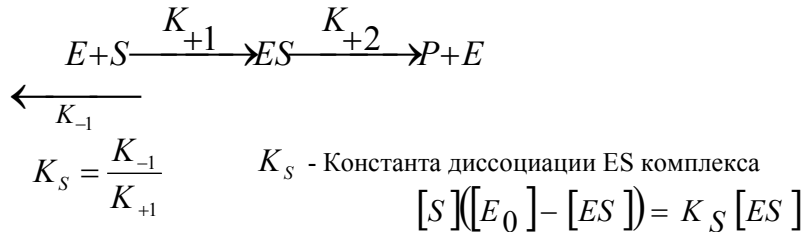
Ферментативная реакция состоит из 2 стадий: при первой стадии образуется комплекс фермент-субстрат, во второй стадии этот комплекс расщепляется на свободный фермент готовый к взаимодействию с новой молекулой субстрата и продуктами реакции. Его можно показать в нижеследующей формуле:



E- фермент, S -субстрат, ES – комплекс фермент-субстрат, P- продукт реакции.

Образовавшийся комплекс фермент-субстрат при определенном промежутке времени подвергается диссоциации, фермент приобретает первоначальную форму, а субстрат под воздействием фермента расщепляется еще на мономеры.

K_{+1} - Константа скорости образования ES комплекса, K_{-1} , K_{+2} - Константа скорости расщепления ES комплекса в двух направлениях.



$[E_0]$ – концентрация первоначального фермента ферментативной реакции

$[S]$ - концентрация субстрата

$[ES]$ – концентрация комплекса «фермент-субстрат»

$([E_0] - [ES])$ – концентрация фермента не связанный с субстратом комплекса.

Например, в наших опытах фермент амилаза выделяемый клеткой микромицетов расщепляет мономера крахмала - молекулы глюкозы только в определенных связях, это приводит к образованию зоны обесцвечивания. Насколько быстро образуется зона обесцвечивания, это свидетельствует о скорости работы комплекса фермент-субстрат.

Необходимо еще отметить, что наши исследования показали, что самое минимальное значение времени образования и исчезновения комплекса фермент-субстрат (ES) приходилось на 8 сутки (рис.15). Это важный показатель, он показывает, на какие сутки выделение фермента клеткой микромицетов доходит до максимальной величины, а также прочность создания комплекса фермент + субстрат, и отражает длительность сохранения соединения фермент-субстрат. Только после образования комплекса фермент-субстрат, фермент имеет возможность расщеплять субстрат.

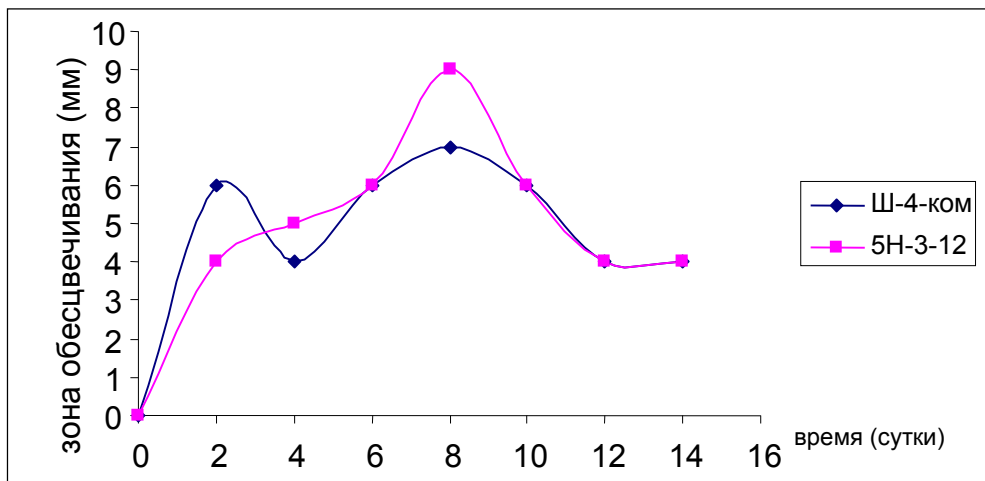


Рис. 15. Амилолитическая активность штаммов Ш-4-ком -при 40°C, 5Н-3-12 при 50°C температуры

Как показано на рис. 16 во время культивирования, в зависимости от возраста культуры, время образования комплекса фермент-субстрат, продолжительность сохранения этого соединения и время подвергания этого комплекса к диссоциации были разными. Активность фермента молодых культур (2-4 суточные), а также 12 суточных культур показала, что длительность сохранения комплекса ES была больше чем в остальные сутки культивирования, так она продлилась от 50 до 80 мин.

Фермент, полученный на 6 и 8 сутки культивирования, образует комплекс с субстратом и за короткий срок времени, т.е. за 30 мин этот комплекс подвергается к расщеплению, образуя зоны просветления. Следовательно, амилолитическая активность энзима при 8 суточном росте достигает высокой величины.

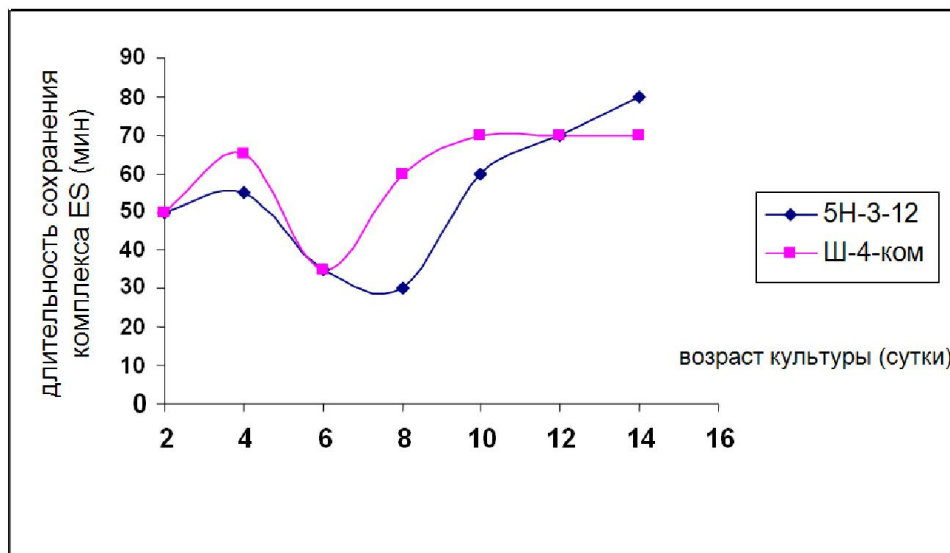
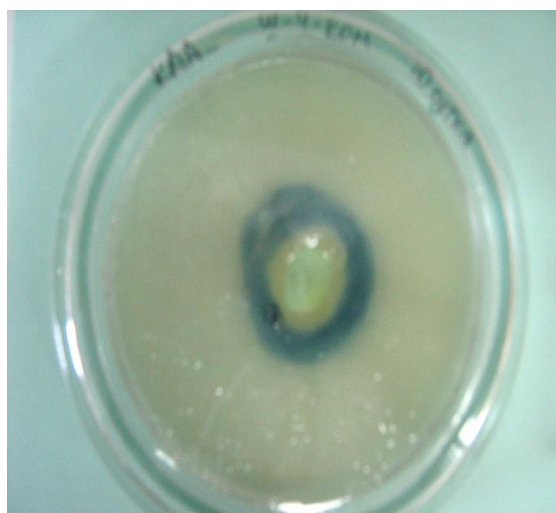


Рис. 16. Время образования и диссоциации ES комплекса штаммов 5H-3-12 и Ш-4-ком в разные сутки культивирования

Таким образом, по итогам проведенных исследований можно прийти к нижеследующим выводам: микромицет выращенный на картофельной коже, содержащей полисахарид крахмал, максимально начинает вырабатывать фермент амилазу и достигает высокой активности на 8 сутки. По полученным данным максимальная ферментативная активность штамма 5H-3-12 приходится на 8 сутки, а штамма Ш-4-ком на 6 сутки роста. После 12 суток тоже отмечалась работа этого комплекса, но появление обесцвечивающей зоны требовало большего времени (рис.17).



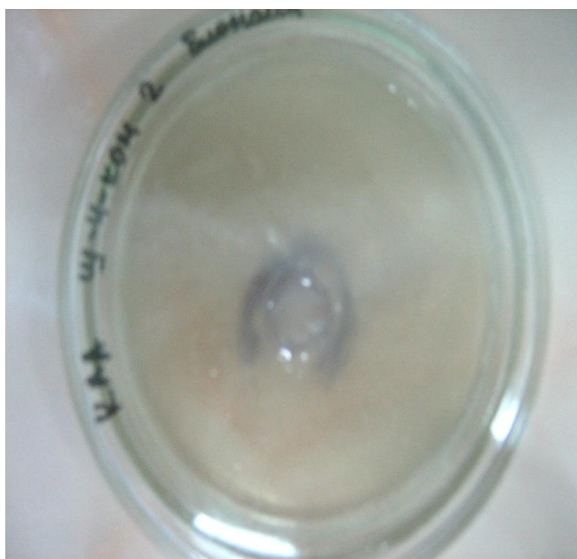


Рис. 17. Образование комплекса Фермент- субстрат и его исчезновение со временем .

Литература:

1. Березин И. В. Исследования в области ферментативного катализа и инженерной энзимологии. – М.: Наука, 1990.-384с.
2. Грачева И. М., Кривова А. Ю. Технология ферментных препаратов. – М.: Элевар, 2000.-512с.
3. Елинов Н.П.1985.Микробиологический синтез полисахаридов и их применение для пищевых целей./ Использование биомассы микроорганизмов для пищевых целей. Сборник научных трудов, Пущино, стр.72-89.
4. Лобанюк А.Г., Павловская Ж.И.1976.Рост и синтез Сх – целлюлозы *Trichoderma lognorum* на различных источниках углерода./Микробный синтез биологически активных соединений. Минск.стр.150-160.
5. Лобанюк А.Г. 1976.Исследование биосинтеза пектиназ, целлюлаз и лизоэнзимов микроорганизмами./ Микробный синтез биологически активных соединений. Минск. стр.106-120.
6. Anonymus (2003). Données chiffrées, les palmiers dattiers en Algérie. Sous-direction des statistiques agricoles, Ministère de l’Agriculture et de Développement rural, Algeria. N° 04.
7. Noreddine Kacem-Chaouche , Zahia Maraihi , Jacqueline Destain, Philippe Thonart . 2005.
8. Study of catalase production by an *Aspergillus phoenicis* mutant strain in date flour extract submerged cultures. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9 (3), 173–178.