

5. Дженнингс В., А. Рапп. Подготовка образцов для газохроматографического анализа. – М.: Мир, 1986. 116 с.
6. Берчфильд Г., Э. Сторрс., Газовая хроматография в биохимии – М.: Мир, 1964.
7. Коцев Н., Н. Пецев. Наръчник по газова хроматография. София, Университетско изд. «Св. Клемент Орхидски» 1994, с.439.
8. Уайт А., Ф.Хендлер, Э.Смит, Р.Хилл, И.Леман. Основы биохимии – М.: Мир, 1981.- Т. 1-3.
9. Ленинджер А. Биохимия.- М.: Мир, 1976 С. 957.
10. Цибилова Д.Ц., Д.Б. Распутина, Д.Н. Зылыкеева и др. К исследованию листьев и шрота облепихи – Биология, химия и фармакология облепихи. Сб. – Новосибирск, Наука, 1983.- С.107.– 109.

УДК 665.3:547.979.8

## РЕГУЛЯЦИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТОГО СИНТЕЗА ПРОВИТАМИНА А В УСЛОВИЯХ ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

*Л.В.Кричковская, Е.А. Кунщикова, Е.Т. Жилякова, С.И. Чернышов*

Национальный технический университет «ХПИ, (г. Харьков),

Белгородский государственный университет, (г. Белгород)

Крахмально-паточный комбинат (г. Верхне-Днепровск)

Интерес к производству биологически активных веществ биотехнологическими методами обусловлен, в том числе и экологическим состоянием окружающей среды. В последнее время экологическое состояние почв, снижение ее плодородия и накопление различных источников заболеваний растительного сырья с одновременным снижением посевных площадей, а также отсутствием на Украине плантаций облепихи, заставляют уделять все более пристальное внимание биотехнологическим способам получения биологически активных веществ, например, таких как каротин. Они находят всё более широкое применение при разработке новых лекарственных препаратов. Проблема оптимизации биосинтеза  $\beta$ -каротина привлекает внимание исследователей в связи с расширением областей практического применения  $\beta$ -каротина и в народном хозяйстве.

Среди изученных микроорганизмов сверхсинтез установлен у мицелиального гриба *Blakeslea trispora*, используемого в настоящее время для промышленного получения микробиологического каротина. Муковый гриб, обладая способностью к сверхсинтезу каротина и жирных кислот линолево-линоленового типа, представляет собой хорошую мишень для изучения действия различных химических факторов на образование липидных продуктов и физиологическое поведение биомассы микроорганизмов.

На основе анализа экспериментальных данных, полученных при культивировании микрогриба, проведена оценка состояния опытно-промышленного процесса микробиологического синтеза бета-каротина; изучены закономерности ассимиляции основных источников питания продуцентом, влияние изменения рН на накопления целевого продукта ферментации. Установлена зависимость выхода бета-каротина от времени введения в ферментационную среду стимуляторов каротиногенеза никотинамида и  $\beta$ -иона.

Исследовано влияние ряда витаминов на рост *Blakeslea trispora*. Показано, что никотинамид угнетает рост, а витамины А, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, К<sub>3</sub> интенсифицируют его. Полученные результаты позволили выработать условия оптимизирующих воздействий на биотехнологическую систему, оценить целесообразность и направление оптимизации отдельных параметров производства микробиологического каротина.

На основании проведенных исследований разработаны, проверены в опытно-промышленных условиях на Верхне-Днепровском крахмалопаточном комбинате предложения по оптимизации существующего процесса получения бета-каротина, что позволило заметно улучшить его показатели: увеличить выход целевого продукта и, как следствие, снизить его себестоимость.

Для выработки тактики оптимизирующих воздействий на исследуемый процесс

выполнены эксперименты по изучению влияния основных технологических параметров на выход целевого продукта, данные приведены в табл. I. Выявлена положительная корреляция выхода бета-каротина с исходной концентрацией аминного азота ( $R=32\%$ ). Всего в процессе ферментации гриб использует около 64 % аминного азота питательной среды. Положительная корреляция обнаружена также между начальной концентрацией редуцирующих веществ и конечным накоплением биомассы ( $R = 21\%$ ), что согласуется с общепринятым взглядом на углеводы как на ростовые субстраты. С выходом целевого продукта этот параметр значимо не коррелировал. Не обнаружено связи между начальной концентрацией неорганического фосфора с конечными значениями накопления биомассы и бета-каротина. В процессе ферментации он используется в среднем на 49%. (табл. 1).

Для более точной оценки зависимости выхода бета-каротина от продолжительности процесса во всех ферментациях изучена динамика накопления целевого продукта во временном интервале 38-100 часов.

Описанные выше опыты выполнены в регламентном режиме введения стимулятора каротиногенез -  $\beta$ -ионон на 47 ч. ферментации. Однако, разные авторы рекомендуют вводить бета-ионон в ферментационную среду в период от 24 до 48 часов с начала ферментации. Поскольку бета-каротин является вторичным метаболитом, было установлено, что стимулятор целесообразно вносить в ферментер после окончания интенсивного роста гриба, то есть в период окончания трофофазы и начала идиофазы. Показано, что для *Blakeslea trispora* этот период начинается в районе 37 часов с начала его культивирования в ферментере [1]. С учетом этих данных проведено исследование зависимости выхода целевого продукта от времени введения стимулятора. Последний параметр изменяли в диапазоне 35-50ч с начала ферментации. Все ферментации (60) выполнены в соответствии с технологическим регламентом без явных отклонений. Среднестатистическая продолжительность процесса выдерживалась на уровне 100ч. Отдельные операции отличались по времени введения стимулятора.

Таблица 1

Основные технологические параметры ферментации  $\beta$ -каротина

Параметры	M $\pm$ m
Начальная концентрация аминного азота, мг%	72,91 $\pm$ 2,823
<b>Начальная концентрация редуцирующих веществ, %</b>	1,69 $\pm$ 0,07
Начальная концентрация неорганического фосфора, кг/мл	436,82 $\pm$ 12,34
Посевная биомасса (+) штамма, кг	1,36 $\pm$ 0,06
Посевная биомасса (-) штамма, кг	12,96 $\pm$ 0,49
Конечная концентрация аминного азота, мг%	26,64 $\pm$ 0,53
Конечная концентрация редуцирующих веществ, %	0,23 $\pm$ 0,006
Конечная концентрация неорганического фосфора, мкг/мл	228,3 $\pm$ 6,6
Конечное рН (начальное – 6,31 $\pm$ 0,07)	7,01 $\pm$ 0,04
Конечное накопление биомассы, г/л	37,34 $\pm$ 0,68
Конечное накопление бета-каротина, г/л	1,25 $\pm$ 0,07

Изменения других параметров процесса носили пассивный характер. В табл. 2 показано влияние времени введения стимулятора каротиногенеза в культуральную жидкость в процессе ферментации на выход продукта.

При снижении времени введения бета-ионона с 50 до 40 часов выход каротина преимущественно повышается, а далее наблюдалось некоторое снижение синтеза. Исход ферментации определяется кислотностью питательной среды до и после стерилизации, на 35 ч процесса приводят к снижению выхода бета-каротина; рН же на 20 ч связан с выходным параметром обратной зависимостью.

С учетом выявленной неоднозначности влияния кислотности среды изучена динамика изменения рН культуральной жидкости в течение ферментации. На начальных

этапах ферментации рН среды несколько снижается, а после 10-20 ч начинает возрастать. К 35 ч рН во всех случаях превышает исходное значение (в среднем 6,5 против 6,3) и далее до конца ферментации повышается вплоть до слабоосновных значений. Снижение кислотности культуральной жидкости в ходе ферментации объясняется, вероятно, накоплением в ней основных веществ, в том числе аммиака [2].

Таблица 2

Параметры ферментации в опытах по оценке состояния процесса биосинтеза бета-каротина

Параметры	Изменение параметров в процессе ферментаций	
	72 часа	100 часов
Аминный азот, мг%	72-93	93-120
Фосфор, мкг/мл	254-410	410-492
Редуцирующие вещества, %	0,9-1,8	1,8-2,7
рН после стерилизации	6,5-6,9	6,3-6,9
рН на 20 ч	6,1-6,5	6,3-6,8
рН на 35 ч	7,1-7,6	7,2-9,3
рН до стерилизации	7,2-7,6	7,1-9,2
Посевная биомасса (+) штамма, кг	0,92-1,09	1,03-1,49
Посевная биомасса (-) штамма, кг	4,50-10,90	10,85-13,95
Биомасса на 35 ч, г/л	14-26	26,00-40,35
Бета-каротин на 35 ч, г/л	0,07-0,18	0,06-0,07
Бета-каротин на 45 ч, г/л	0,25-0,48	0,15-0,28
Бета-каротин конечный продукт, г/л	1,14-1,32	1,12-1,26

Известно, что максимальная скорость синтеза бета-каротина у *Blakeslea trispora* достигается в интервале рН 6,4-6,7, в изучаемой же биотехнологической системе, рН к концу ферментации повышается до 7,0-7,3. Установлена положительная корреляция исходных и конечных значений рН питательной среды (K=24%). Высокие значения рН в начале ферментации могут привести к чрезмерному ее защелачиванию к моменту окончания процесса. Характер изменения рН среды на начальных этапах ферментации объясняется особенностями ассимиляции глюкозы продуцентом. Изучение динамики расходования редуцирующих веществ питательной среды свидетельствует об их практически полном исчерпании к 10-20 часам ферментации.

Одновременно образуются органические кислоты, коэффициент корреляции рН на 20 ч и исходных редуцирующих веществ составляет -21 %. Поскольку катаболизм глюкозы у гриба протекает по пути гликолиза, уменьшение рН питательной среды объясняется, видимо, накоплением пировиноградной кислоты. Установлено, что к 10-20 часам ее концентрация в культуральной жидкости достигает  $3 \cdot 10^{-2}$  -  $3 \cdot 10^{-3}$  мас. %. Под воздействием пируватгидрогеназного мультиферментного комплекса пируват превращается в ацетилкоэнзим А и включается в энергетический и конструктивный метаболизм, в том числе и каротиногенез [2].

По данным [3], изученные концентрации редуцирующих веществ в исходной питательной среде (0,9-2,7%) положительно коррелируют с накоплением биомассы и отрицательно - с выходом целевого продукта. Увеличение концентрации глюкозы сверх 1,7 % статистически достоверно угнетает каротиногенез. Таким образом, высокий выход целевого продукта обеспечивается средами, содержащими все необходимые источники питания в количествах, достаточных для наиболее быстрого накопления максимально возможной биомассы при одновременном исчерпании к этому моменту глюкозы.

Согласно полученным экспериментальным данным, повышение концентрации аминного азота в питательной среде целесообразно. Однако, он ассимилируется за все время ферментации в среднем на 64 %. Это происходит в том случае, если процесс лимитируется не азотом, а другим компонентом экстракта. По данным экспериментов, наиболее высокий выход бета-каротина (выше 1,4 г/л) достигается при концентрации

аминного азота в исходной питательной среде 125 мг %. Поэтому при приготовлении производственной питательной среды кукурузный экстракт необходимо вносить в нее в количествах, обеспечивающих указанную концентрацию аминного азота.

С целью экспериментальной проверки полученных выводов на опытно-промышленном оборудовании Верхнеднепровского крахмалопаточного комбината проведены пробные ферментации. При этом наблюдались следующие значения технологических параметров: аминный азот -125 мг %; редуцирующие вещества - 1,7 %; неорганический фосфор -260 мкг/мл; рН питательной среды перед ее стерилизацией - 7,0; время введения стимулятора каротиногенеза - 40 ч; соотношение (+) и (-) форм посевного материала - 0,26; продолжительность процесса - 100 ч. По результатам нескольких (8) таких ферментаций выход каротина повысился по сравнению с исходным в 1,3 раза (в среднем 1,62 против 1,24 г/л), а накопление биомассы в конце ферментации. увеличилось на II % (в среднем 42,55 против 38,21 г/л).

Результаты опытно-промышленных испытаний свидетельствуют об эффективности оптимизации исследуемого биотехнологического процесса и возможности значительного улучшения показателей производства при использовании на практике предложенных рекомендаций. Продолжительность ферментации - легко регулируемый параметр, от правильного выбора которого в значительной степени зависят эффективность использования оборудования, себестоимость целевого продукта и как следствие - экономическая эффективность производства.

Таким образом, используя регулирующие факторы биотехнологического процесса можно увеличить выпуск экологически чистого продукта - провитамина А - β-каротина.

#### Литература

1. Бобнева С.М. и др. Способ получения β-каротина //А.с. СССР № 434751.
2. Бондарь И.В., Санникова В.М. Зависимость каротино-синтетической активности культуры *Blakeslea trispora* от условий хранения. //Биотехнология.- 1985.- №4.- С. 47-48.
3. Васильченко С.А., Кунщикова И.С., Бондарь И.В. Ассимиляция аминокислот культурой *Blakeslea trispora* //Микроб.журнал.- 1990.- Т.52, №1, -С. 32-34.

УДК 577.12:612.392.83

## БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕЧЕНИ ПТИЦ ПРИ ВЫПАИВАНИИ ИМ РАСТВОРОВ ЙОДОВИДОНА И БЕТА-КАРОТИНА

*Л.Р. Закирова<sup>1</sup>, Д.В. Дейнеко<sup>2</sup>, А.Я. Старокожева<sup>1</sup>*

1 – БелГУ

2 – ВНИИ животноводства, Подольск

Йод - важнейший биомикроэлемент, активно влияющий на обмен веществ в организме. Выполняет свои биологические функции в составе йодированных производных тиронина - тиреоидных гормонов -трийодтиронина и тироксина. В норме в организме взрослого человека содержится примерно 20-30 мг йода (диаграмма 1). В крови здорового человека содержится 8,5±3,5 мкг% йода, от 0,5 до 1,0 мкг% составляют иодиды, остальное - белоксвязанный йод, 35% йода находится в плазме крови. Принято считать, что человек должен получать минимум 50-60 мкг йода в сутки. Однако для нормального функционирования щитовидной железы, а также течения метаболических процессов в организме здорового человека (по данным Министерства Здравоохранения РФ) суточная потребность человека в йоде в среднем 3 мкг на 1 кг веса тела.

Недостаток поступления йода в организм приводит к нарушению функции щитовидной железы - компенсаторному увеличению массы ткани щитовидной железы за