

УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

На правах рукопису

УДК 663.1:576.809.513

ПОВАЛЯЄВА Ілона Василівна

РОЗРОБКА СПОСОБУ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОЇ СТИМУЛЯЦІЇ
ПРОДУЦЕНТІВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Спеціальність 03.00.23 - біотехнологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата технічних наук

Київ - 1993

7620.20

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Українському Державному
Університеті Харчових Технологій, м. Київ

Науковий керівник - кандидат технічних наук, доцент
Пічко Вікторія Борисівна

Офіційні опоненти - доктор технічних наук, професор,
академік АН України
Нікітін Геннадій Олександрович

- кандидат біологічних наук, старший
науковий співробітник
Буглова Тетяна Трифонівна

Провідна організація - науково-технічний центр прикладної
біотехнології, м. Обухів

Захист відбудеться "10" листопада 1993 р. о 14 годині на засі-
данні спеціалізованої ради К 068.17.03 при Українському Державному
Університеті Харчових Технологій за адресою:

252017, м. Київ, вул. Володимирська, 68 (ауд. А-311)

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Українського
Державного Університета Харчових Технологій.

Автореферат розісланий "8" листопада 1993 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
кандидат технічних наук, доцент

Семенова О. І.



ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Важливим аспектом ефективності виробництва біологічно активних речовин мікробним синтезом є використання високопродуктивних штамів, що мають цінні біосинтетичні властивості. Нині для створення штамів надсинтетиків використовують генноінженерні методи, які дозволяють різко підвищити накопичення цільового продукту ферментації. Поряд з генноінженерними штамми продовжується використання продуцентів, що отримані традиційними методами. Підтримання початкової біосинтетичної активності виробничих штамів-продуцентів досить проблематично. Проблеми з'являються при використанні генноінженерних штамів-мутантів через те, що часто при їх тривалому зберіганні спостерігається спонтанна мінливість культури. Існують численні засоби зберігання штамів, але жодний з них не гарантує стабільності штама по основному його показнику - продуктивності. Тому необхідно і в подальшому продовжувати пошук способів підвищення біосинтетичної здатності продуцентів. Численні дослідження показують, що різноманітні фізико-хімічні фактори здатні певним чином впливати на метаболічні процеси мікроорганізмів, виявляючи як інгібуючу, так і стимулюючу дію на клітини в залежності від виду впливу, його інтенсивності та стану клітини. Серед таких впливів особливе місце займає група електромагнітних факторів різних характеристик. Дане дослідження спрямоване на розробку ефективного методу підвищення біосинтетичної здатності продуцентів біологічно активних речовин з використанням властивості клітин мікроорганізмів змінювати метаболізм під дією електромагнітного поля.

Мета і задачі дослідження. Метою дослідження було вивчення впливу електромагнітного поля, що створюється промисловим апаратом, на мікроорганізми - промислові продуценти біологічно активних речовин і розробка способу стимуляції засівного матеріалу для отримання підви-

щених кількостей цільового продукту.

Означена мета визначила основні задачі дослідження:

- вивчити дію електромагнітного поля на продуценти біологічно активних речовин, що відносяться до різних таксономічних груп;
- визначити найбільш чутливі до дії фізіологічні становища засівного матеріалу продуцентів;
- підібрати оптимальні параметри електромагнітної стимуляції біосинтезу;
- дослідити дію електромагнітного поля на цільові продукти біосинтезу;
- вивчити можливість отримання стимулюючого ефекту накопичення цільового продукту при культивуванні на оброблених електромагнітним полем середовищах;
- вивчити можливість збереження і передачі ефекту електромагнітної стимуляції в наступних генераціях культури при пересівах;
- обґрунтувати концепцію, що визначає причини спостережуваних ефектів.

Наукова новизна. В результаті вивчення електромагнітного поля лінійного індукційного апарату на комплекс промислових мікробних продуцентів, що відносяться до різних таксономічних груп, виявлена принципова можливість стимуляції процесів біосинтезу біологічно активних речовин. Підібрані конкретні умови отримання підвищених кількостей цільових продуктів мікробного синтезу. Встановлена біологічна активність вивчаемого поля по відношенню до ферментів та лектинів, що здебільшого пояснює перехід клітин мікроорганізмів на новий рівень метаболізму. Вперше виявлена кореляція між величиною ефекту стимуляції біосинтезу біологічно активних речовин, швидкістю надход-

ження поміченої по вуглецю глюкози до клітини і тривалістю дії електромагнітного поля на засівний матеріал. Наукова новизна розробленого способу підтверджена авторським свідоцтвом на винахід №1592328 А 1 від 15.09.90.

На вахист виносяться такі наукові положення:

- отримання стимулюючого ефекту накопичення біологічно активних речовин промисловими мікроорганізмами-продуцентами можливе під впливом віхрового еліптичного електромагнітного поля;
- використання електромагнітного поля складної конфігурації є доцільним для стимуляції мікроорганізмів-продуцентів всіх таксономічних груп;
- причиною переходу мікробної клітини на рівень метаболізму, що забезпечує підвищення накопичення цільового продукту є інтенсифікація транспортних процесів, активація ферментних систем, зміна стану макромолекул під дією електромагнітного поля складної конфігурації;
- розроблений на основі теоретичних та експериментальних досліджень спосіб електромагнітної стимуляції продуцентів може бути реалізований на біотехнологічних підприємствах із значним економічним та екологічним ефектом.

Практична цінність роботи обумовлена тим, що доказана можливість використання електромагнітної обробки засівного матеріалу промислових продуцентів для отримання підвищених кількостей цільового продукту. Розроблений спосіб електромагнітної стимуляції продуцентів біологічно активних речовин характеризується простотою, технологічністю та економічною ефективністю. Екологічним аспектом впровадження запропанованого способу в промислову практику є зниження кількості стічних вод та повітряних викидів внаслідок зменшення чис-

ла ферментацій. Пропонується використання електромагнітної обробки мікроорганізмів у селекційній практиці підприємств галузі. Показана можливість отримання високого та стійкого ефекту активації ферментних і лектинових препаратів, що дозволяє рекомендувати електромагнітну обробку при промисловому використанні ферментів.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на Всесоюзній конференції "Разработка и внедрение вихревых электромагнитных аппаратов для интенсификации технологических процессов - АВС-89" (Тамбов, 1989), Всесоюзній конференції "Методы получения, анализа и применения ферментов" (Юрмала, 1990), Республіканській науково-технічній конференції "Разработка и внедрение высокоэффективных ресурсосберегающих технологий, оборудования и новых видов пищевых продуктов в пищевую и перерабатывающую отрасли АПК" (Киев, 1991), Симпозиумі "Химия протейолитических ферментов" (Москва, 1993), Міжнародній науково-технічній конференції "Разработка та впровадження новых технологий та обладнання у харчову та переробну промисловості" (Київ, 1993). По підсумках досліджень опубліковано 10 наукових праць, серед яких - одне авторське свідоцтво на винахід.

Структура та обсяг роботи. Матеріал дисертаційної роботи викладений в 4 розділах і складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення, висновків, додатків. Робота викладена на 150 сторінках, вміщує 21 таблицю та 10 малюнків. Список літератури включає 172 найменування вітчизняних та зарубіжних авторів.

Зміст роботи. В огляді літератури наведено аналіз сучасних даних про реакції мікроорганізмів на деякі природні та техногенні фактори електромагнітної природи. Показано, що висока чутливість мікроорганізмів до електромагнітного поля обумовлює в них морфологічні, фізіолого-біохімічні, культуральні та генетичні зміни. Ефективність

дії електромагнітного поля залежить від його характеристик. Добором параметрів впливу можливо добитися як інгібуючого, так і стимулюючого ефекту на життєдіяльність мікроорганізмів.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проводились в лабораторних та виробничих умовах. Як об'єкти досліджень використані промислові продуценти Ладижинського заводу ферментних препаратів: *Pen. solitum* шт.1 М, *Asp. awamori* шт. 120/177, *Bac. subtilis* шт. 72; промислові продуценти Трипільського біохімічного заводу *Brevibacterium* sp. 22 и sp. E-531; промисловий продуцент Плахтянського заводу кормових антибіотиків *Str. aureofaciens* шт. 019; промислові продуценти Київського заводу медичних препаратів *Bac. polytuxa* шт. BC 153-29/3, *Str. aureofaciens* шт. 633; *Sacch. cerevisiae* раса XII; продуценти, що знаходяться на стадії впровадження *Str. robeus* шт. 606 (КТІХП), *Str. nigrificans* шт. ІМВ 2082 і *Bac. subtilis* шт. 316 М (Ін-т мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного АН України).

✓ Джерелом електромагнітного поля (ЕМП) є лінійний індукційний апарат (ЛІА) промислового випуску, що працює від мережі промислового струму 50 Гц. Поле ЛІА характеризується специфічною просторовою структурою, створеною двома бігучими магнітними полями, що направлені назустріч. Індукція створеного ЕМП складної конфігурації становить 0,1 Тл. Дії ЕМП ЛІА підлягав насівний матеріал продуцентів, що знаходився в споровому, вегетативному станах, на щільних та рідких живильних середовищах, у вигляді водної суспензії. Культивування з метою отримання продукту біосинтезу здійснювалось за стандартними або регламентними схемами. Вплив ЕМП на промислові продуценти визначався за зміною накопичення цільових продуктів біосинтезу. Визначались ферментативні активності: глюкоамілазна - глюкооксидазним способом; глюкозоізомераза - методом Dischod; протеолітична - методом ФЛШ і методом Ансона; еластаза; ліполітична; β -фрукто-

фураноідазна - поляриметричним методом. Активність хлортетрацикліну визначалась хімічним способом, поліміксину В - біологічним методом. Кількість лізину визначалась методом електрофорезу на бумазі. Виявлення лектинів здійснювалось методом гемаглютинації; вуглецьав'яуча специфічність лектинів визначалась по реакції інгібування гемаглютинації. Кількість білку визначалась за методом Bradford. Накопичення мікробної біомаси визначалось ваговим методом. Ізоелектричне фокусування ферментних препаратів лужної серинової протеїнази проводили в борат-поліольній системі при градієнті рН 9-12.

Для вивчення впливу ЕМП ЛІА на транспорт глюкози використаний радіоізотопний метод адаптований для дріжджів *Sacch. cerevisiae* раса XII і бактерій *Bas. subtilis* 316 М. Клітини інкубувались в розчині глюкози, поміченій по атому вуглецю. Відбір проб проводився кожні 10 хвилин. Клітини відфільтровувались і відмивались на фільтрах охолодженим розчином солей живильного середовища. Фільтри з клітинами висушувались при 60 °С на протязі 30 хвилин. Кількість накопиченої клітинами радіоактивної глюкози визначалась при радіометруванні на сцинтиляційному лічильнику 1217 RACKBETA (LKB/WALLAC) з використанням сцинтиляційної рідини ЖС-103.

Результати, що подані графічно були оброблені на IBM-сумісному персональному комп'ютері за допомогою програми GRAPHER версії 1.75 фірми Golden Software, Inc. Функціональні залежності подані у вигляді поліномів 2-4 ступенів.

Результати та їх обговорення. В роботі досліджено вплив ЕМП ЛІА на промислові продуценти біологічно активних речовин (БАР) та штами, що знаходяться у стадії впровадження (мікрومیцети, дріжджі, актиномицети та бактерії). Зафіксовано ефект стимуляції накопичення цільових продуктів в наслідок обробки полем ЛІА засівного матеріалу продуцентів. Ефективність електромагнітної (ЕМ) обробки залежить від

тривалості впливу, фізіологічного стану засівного матеріалу, мікроб-
точення клітин продуцентів.

Стимуляція біосинтезу соліаіма продуцентом *Pen. solitum* у виг-
ляді водної суспензії спор становила 40 % при тривалості обробки по-
лем ЛІА 20 хвилин. При збільшенні експозиції до 30 і 40 хвилин фер-
ментативна активність культуральної рідини знижується в порівнянні з
досягненим рівнем і складає 119 і 108 % відповідно до контролю. Сти-
муляція біосинтезу глікоамілази продуцентом *Asp. awamori* в рідкому
середовищі становила 18 % при тривалості обробки 30 хвилин. Підви-
щення тривалості обробки до 40 хвилин не веде до збільшення ефекту
активації і складає при цьому 9%. Спостерігались деякі морфологічні
зміни, відповідні змінам біосинтетичної спроможності.

ЕМП ЛІА виявляє стимулюючу дію на клітини дріжджів, яка поля-
гає в збільшенні накопичення біомаси дріжджами *Sacch. cerevisiae* на
12% при тривалості обробки водної суспензії засівного матеріалу 40
хвилин.

Дією ЕМП ЛІА на продуценти хлортетрацикліну *Str. aureofaciens*
шт. 633 і шт. 019 досягнуто збільшення накопичення цільового продук-
ту в культуральній рідині на 21 % без зміни накопичення біомаси при
тривалості обробки спорового засівного матеріалу 20 хвилин.
Послідовна обробка ЕМП спорового засівного матеріалу на протязі 20
хвилин і потім така ж обробка отриманого вегетативного засівного ма-
теріалу, призводить до збільшення накопичення хлортетрацикліну
в культуральній рідині на 18 % (табл. 1).

Дія ЕМП ЛІА на засівний матеріал продуцентів глікозоізомерази
Str. robeus шт. 606 і *Str. nigrificans* шт. 1MB 2082 виявляється у
зростанні глікозоізомеразної активності і збільшенні приросту біома-
си, що дає підвищення продуктивності в разі 20-хвилинної обробки ✓
спор на 32 % в порівнянні з контролем, в разі послідовної обробки

спор і вегетативних клітин по 20 хвилин - на 74% (табл. 2).

Таблиця 1
Вплив ЕМП ЛІА на біосинтез хлортетрацикліну
Streptomyces aureofaciens шт. 633

Вид засівного матеріалу, обробленого ЕМП	Тривалість дії, хвил.	Активність хлортетрацикліну, Од/мл	% зміни по відношенню до контролю
контроль	без обробки	5870 ± 240	100
спори	20	7126 ± 193	121
	40	6770 ± 154	115
	60	6352 ± 202	108
вегетативні клітини	20	6175 ± 167	105
	40	5826 ± 188	100
спори і вегетативні клітини	20 + 20	6920 ± 254	118
	40 + 40	5858 ± 214	100

Таблиця 2
Вплив ЕМП ЛІА на біосинтез глюкозоізомерази
Streptomyces robeus шт. 606

Вид засівного матеріалу, експозиція ЕМП 20 хвил.	Глюкозоізомеразна активність, од/г	% зміни активності по відношенню до контролю	абсолютно суха біомаса г/л	Продуктивність, од/л	% зміни продуктивності
Без обробки (контроль)	50,72±0,41	100	10,38±0,24	526,6	100
Спори	57,31±0,50	113	12,16±0,30	696,9	132
Вегетативні клітини	55,28±0,33	109	11,92±0,18	658,9	125
Спори і вегетативні клітини	68,57±0,46	135	13,40±0,25	918,8	174

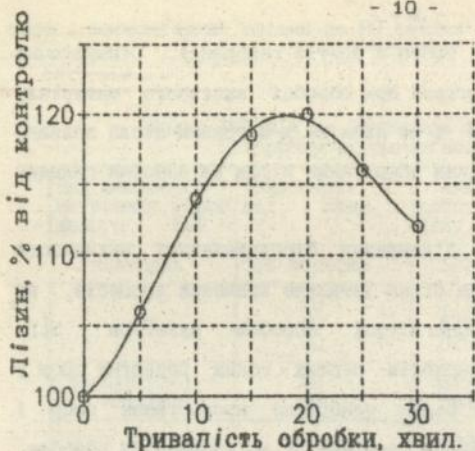
Для культури *Str. aureofaciens* шт. 019 встановлено, що онака підвищеної біосинтетичної спроможності після електромагнітної обробки спор має властивість релаксації при постадійному розмноженні вегетативного засівного матеріалу. Спостерігається вирівнювання біосинтетичної спроможності обробленої культури до активності конт-

роля після трьох пасажів, тобто в третій генерації. Стимулюючий ефект дії поля ЛІА спостерігається при обробці засівного матеріалу безпосередньо перед засівом і не пізніше 1-2 години після впливу. Падіння активності за три години зберігання після ЕМ обробки складає 12%, а за 4 години - 16%.

Для встановлення причин підвищення біосинтетичної активності актиноміцетів було проведено більш детальне вивчення процесів, що відбуваються після електромагнітної обробки культури *Str. aureofaciens* шт. 019. Мікроскопія перших годин розвитку спор у рідкому середовищі визначила більш однорідне проростання спор і створення вегетативних гіфів у варіанті, що пройшов ЕМ обробку. Підсумки моноклонових розсівів показали, що ЕМ обробка спорового засівного матеріалу веде до підвищення кількості морфологічних варіантів, відповідаючих високому рівню біосинтетичної активності на 40%, що підвищує однорідність вегетативного засівного матеріалу і збільшує вихідний рівень біосинтетичної активності. Це явище може бути використано як захід селекційної роботи з актиноміцетами на підприємствах галузі.

Дію ЕМП ЛІА на бактерії досліджено на чотирьох продуцентах. Досягнуто збільшення накопичення поліміксину В при обробці спорового засівного матеріалу *Bac. polytuxa* на протязі 20 хвилин, що склало 22%. Така ж сама обробка плівкового засівного матеріалу *Bac. subtilis* шт. 72 дозволяє отримувати 10% збільшення накопичення лужної протеази в культуральній рідині.

Ефект стимуляції накопичення лізину після 20-хвилинної обробки культури *Brevibacterium sp. 22* і *sp. E-531* на агаризованому середовищі був нестійким та приймав значення 105-120 % по відношенню до контролю в залежності від початкового рівня біосинтетичної активності продуцентів (мал. 1). Помічено збільшення діаметру колоній



Мал. 1. Вплив електромагнітної обробки *Brevibacterium sp. 22* на накопичення лізину

клітин, що підлягали ЕМ обробці. Так, діаметр колоній у контрольному варіанті після 4 діб вирощування на МПА при 30 °С складав 3-4 мм, а після ЕМ обробки клітин - 5-6 мм.

Дія ЕМП ЛІА привела до збільшення культурою *Bac. subtilis* шт. 316 М синтезу лужної серинової протеїнази на 30-40 % і збільшення накопичення лектинів в 4 рази порівняно з контролем при 40 хвилинах експозиції (табл. 3).

Таблиця 3
Залежність активності культуральної рідини *Bac. subtilis* шт. 316 М від тривалості обробки електромагнітним полем

Тривалість обробки, хвил.	АСВ, г/л	Протеолітична активність		% аміни відносно контролю	Лектинова активність,	
		ПО / мл	ПО / г АСВ		-1 титр / мл	-1 титр / г АСВ
0 контроль	2,45±0,14	1,44±0,11	587,1 ±11,40	100	4	1,63 ± 0,9
20	2,40±0,21	1,68±0,08	702,5 ±28,14	119	8	3,36 ± 0,29
40	2,43±0,10	2,0 ±0,04	823,76±17,44	140	16	6,59 ± 0,27
60	2,42±0,18	1,85±0,04	767,48±40,60	130	16	6,65 ± 0,50

Величина стимулюючого ефекту залежить від вихідного рівня біосинте-тичної спроможності культури. Максимальний ефект активації відмічен при обробці засівного матеріалу у вигляді водної суспензії 18-годин-ної культури. Спостерігається кореляція ефектів активації ка-зеїнолітичної і еластазної активностей при обробці всіх варіантів засівного матеріалу, що були досліджені. Обробка морфологічних варіантів полем ЛІА на протязі 40 хвилин викликає збільшення проте-олітичної активності в усіх варіантах, але не таке істотне, щоб відповідати рівню активності Р- і Т-варіантів. Спостерігається збільшення розмірів колоній, що виростили з клітин *Bac. subtilis* 316 М, які підлягали дії поля ЛІА на протязі 40 хвилин. Розмір колоній необроблених клітин становив 10-13 мм, а діаметр колоній оброблених клітин - 15-18 мм.

Підсумки вивчення дії ЕМП ЛІА на промислові продуценти біологічно активних речовин, що відносяться до різних таксономічних груп, узагальнені в табл. 4 (стор. 12).

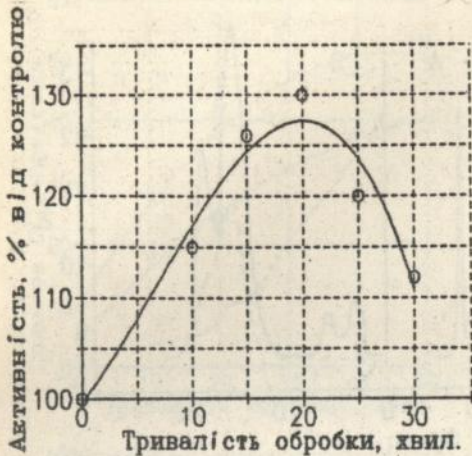
Зафіксовано зміну активностей β -фруктофуранозідази *Sacch. cerevisia* раса XII, лужної серинової протеїнази і лектинів *Bac. subtilis* 316 М. При 20-хвилинній обробці полем ЛІА суспензії клітин *Sacch. cerevisiae* раса XII активність β -фруктофуранозідази зросла на 28% (мал. 2).

Встановлено підвищення протеолітичної активності препарату луж-ної серинової протеїнази при дії поля ЛІА. Обробка розчину препарату в фосфатному буфері рН=7,0 при експозиції ЕМП 55-65 хвилин збільшує активність на 35%, а обробка в трис-боратному буфері рН=12,0 при експозиції 85-95 хвилин дає підвищення активності на 55% відносно контролю. Оброблені препарати більш стабільні при зберіганні. Поле ЛІА впливає на фізико-хімічні властивості лужної серинової протеїна-

Таблиця 4

Дія ЕМП ЛІА на промислові продуценти ВАР різних таксономічних груп

N	Продуцент, штам	Цільовий продукт	Ефект активациі %	Тривалість обробки, хвил.	Фізіологічне становище продуцента
1	<i>Penicillium solitum</i> шт. 1 М	солізім	140	20	водна суспензія спор
2	<i>Aspergillus awamori</i> шт. 120/177	глікоамілаза	118	30	вегетативні клітини
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> раса XII	β -фруктофуранозідаза	112	40	водна суспензія клітин
4	<i>Streptomyces aureofaciens</i> шт. 633 і 019	хлортетрациклін	121 - 119	20	спори на агарі
5	<i>Streptomyces robeus</i> шт. 606 <i>Streptomyces nigrificans</i> шт. ІМБ 2082	гліковоізомераза	135	20	спори і вегетативні клітини
6	<i>Bacillus polymyxa</i> шт. BC-153-29/3-	поліміксин	122	20	спори на агарі
7	<i>Brevibacterium sp. 22</i> і sp. E-531	лізін	120	20	клітини на агарі
8	<i>Bacillus subtilis</i> шт. 72	лужна протеаза	110	20	плівкова культура
9	<i>Bacillus subtilis</i> шт. 316 М	лужна серинова протеїназа лектин	130 - 140 в 4 рази	40 40	водна суспензія клітин



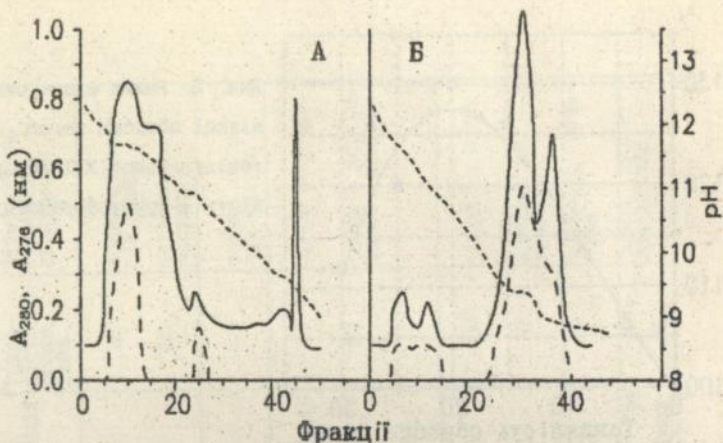
Мал. 2. Вплив електромагнітної обробки *Sacch. cerevisiae* раса XII на активність β -фруктофуранозидази

зи, що виявляється в зміні ізоелектричної точки - в вихідному препараті максимальна кількість білку фокусується при рН 11,4-10,6, а в пробі після 40 хвилин ЕМ дії - при рН 9,3-8,8 (мал. 3).

Спостерігається збільшення питомої гемаглютиніруючої активності у обробленого полем ЛІА препарату лектина в 2 рази в порівнянні з контролем при тривалості дії 40 хвилин. При цьому вуглеводна специфічність обох препаратів не виявляла якісної різниці.

Радіоізотопним методом показано, що обробка суспензії дріжджів *Sacch. cerevisiae* на протязі 30 хвилин полем ЛІА приводить до збільшення швидкості транспорту глюкози C^{14} в клітині на 30% в порівнянні з неекспонованими в ЕМП клітинами (мал. 4).

Вивчення зміни транспортних процесів у бактерій *Bac. subtilis* 316 М в залежності від тривалості ЕМ обробки показала наявність прямої залежності між швидкістю постачання глюкози в клітині і тривалістю дії поля (мал. 5).



Мал. 3. Ізоелектричне фокусування препаратів лужної серинові протеїнази *Bac. subtilis* 316 M

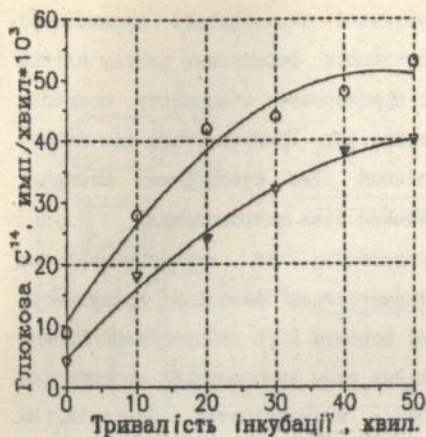
А - контроль; Б - обробка полем

— Білок A_{280}

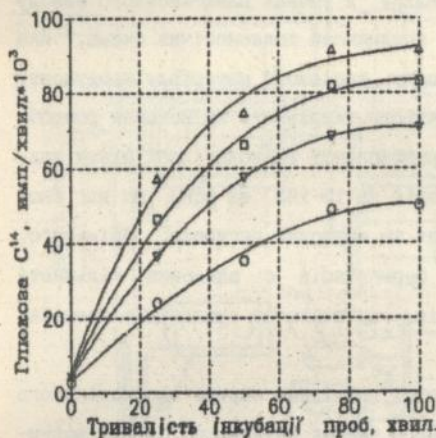
- - - - Протеол. активність, A_{276}

----- Градієнт рН

Порівнюючи ці дані з результатами табл. 3, можна зробити висновок, що при 40 хвилинах експозиції ЕМП зміна швидкості транспорту поживних речовин найбільш сприятлива для біосинтезу клітиною вивчаючих речовин. Збільшення експозиції до 60 хвилин приводить до подальшого зростання швидкості транспорту, однак продуктивна здатність має тенденцію до зниження. Причини збільшення швидкості постачання глюкози в клітини дріжджів і бактерій під впливом ЕМП ЛІА, можуть бути різноманітні. По-перше, швидкість простої дифузії підвищується, якщо під дією ЕПМ в клітині відбуваються процеси, які різко знижують концентрацію глюкози. По-друге, може відбуватися активація ферментів-переносників і підвищується швидкість полегшеної дифузії.



Мал. 4. Вплив електромагнітного поля на транспорт глюкози C¹⁴ у дріжджів *Sacch. cerevisiae* раса XII
o o o o - обробка
v v v v - контроль



Мал. 5. Вплив електромагнітного поля на транспорт глюкози C¹⁴ у бактерій *Bac. subtilis* шт. 316 М
o o o o - контроль
v v v v - обробка 20 хвил.
п п п п - обробка 40 хвил.
Δ Δ Δ Δ - обробка 60 хвил.

Таким чином, по підсумках експериментальних досліджень можна зробити висновок: ЕМП ЛІА виявляє стимулюючу дію на продуценти ВАР, що призводить до підвищення накопичення цільових продуктів. З використанням радіоізотопного методу встановлено, що дія поля ЛІА обумовлює прискорене постачання глюкози в клітини мікроорганізмів.

Аналіз експериментальних даних на основі сучасних теорій магнітобіологічних ефектів дозволяє обґрунтувати концепцію, згідно

якої причиною збільшення біосинтетичної спроможності промислових продуцентів БАР полем ЛІА є активація ферментних систем клітин мікроорганізмів, що призводить до прискорення транспорту поживних речовин та створення продуктів метаболізму. Припускається дія електромагнітного поля на рідкокристалічний стан біологічних мембран, швидкість біохімічних реакцій, фізичний стан макромолекул.

В розділі 4 на основі теоретичних та експериментальних досліджень розроблено спосіб електромагнітної стимуляції продуцентів БАР і розглянуті техніко-економічні аспекти його використання. Приведені варіанти типових процесуальних схем використання способу при культивуванні продуцентів мікроміцетів, актиноміцетів і бактерій. На прикладі отримання хлортетрацикліну в умовах Плахтянського заводу кормових антибіотиків розроблена принципова технологічна схема, яка передбачає електромагнітну обробку засівного матеріалу продуценту (мал. 6, стор.17). Показана можливість технічного здійснення розробленого способу. Впровадження запропонованої технологічної схеми дозволяє зменшити кількість ферментацій на 15-18% на рік, що дає економію матеріальних, енергетичних та трудових ресурсів. Крім того, наслідком скорочення кількості ферментацій є зниження кількості стічних вод і повітряних викидів, що визначає екологічне значення запропонованого способу.

Спосіб випробувано при роботі дослідних партій протиопікового ферментного препарату еластотерави в умовах Київського заводу медичних препаратів (цех N 6). Вихід активності в культуральній рідині контрольних ферментацій (засівний матеріал необроблений полем ЛІА) складав 1,5-3,5 ПО/мл, в ферментаціях з обробленим засівним матеріалом активність складала 4,5-5,0 ПО/мл. Таким чином, виробнича програма може бути здійснена при скороченні кількості ферментацій на 20%.

Показана доцільність використання ЕМП ЛІА в селекційній практиці підтримуючого відбору при роботі з актиноміцетами. Розроблена схема селекційного відбору, яка передбачає електромагнітну обробку моноспорової суспензії культур актиноміцетів. Для *Str. aureofaciens* шт. 019 параметри обробки такі: індукція 0,1 Тл, частота 50 Гц, тривалість дії 20 хвилин. Активність відібраних моноізолятів контрольного варіанту складала 5250 ± 170 ОД/мл, активність моноізолятів, отриманих із обробленого полем насівного матеріалу складала 5664 ± 206 ОД/мл. Крім того, кількість морфологічних варіантів з підвищеною активністю після обробки зростає приблизно в 1,5 рази. ЕМ обробка, як засіб селекційної роботи, підвищує її ефективність. Розроблена "Інструкція використання способу електромагнітної стимуляції продуцентів біологічно активних речовин для селекційної роботи з актиноміцетами" і прийнята до впровадження на Пляхтянському заводі кормових антибіотиків.

Висновки

- ✓ 1. При вивченні дії електромагнітного поля лінійного індукційного апарату з параметрами: індукція 0,1 Тл, частота 50 Гц на мікроорганізми - промислові продуценти зафіксована зміна процесів метаболізму, що призводить до накопичення підвищених кількостей біологічно активних речовин.
- ✓ 2. Ефект активації складав від 10 до 40 % для представників різних таксономічних груп (мікроміцети - *Pen. solitum* шт. 1 М, *Asp. awamori* шт. 120/177; дріжджі - *Sacch. cerevisiae* раса XII; актиноміцети - *Str. aureofaciens* шт. 633 і шт. 019, *Str. robeus* шт. 606, *Str. nigrificans* шт. ІМВ 2082; бактерії - *Bac. polymyxa* шт. БС-153-29/3, *Brevibacterium* sp. 22 і sp. E-531, *Bac. subtilis* шт. 72, *Bac. subtilis* шт. 316 М) і залежав від тривалості дії поля, фізіологічного стану насівного матеріалу, початкового рівня біосин-

тетичної спроможності культури, мікрооточення клітин.

3. Підвищення біосинтетичної спроможності після електромагнітної стимуляції не закріплюється генетично і має властивість релаксації. Для *Str. aureofaciens* шт. 019 спостерігається зниження біосинтетичної спроможності обробленої культури до рівня контролю після трьох пасажів.

4. Стимулюючий ефект дії поля ЛІА спостерігається при обробці засівного матеріалу безпосередньо перед засівом на живильне середовище та не пізніше 1-2 годин після впливу.

5. В окремих випадках відмічено зміну морфологічних ознак культур, що пов'язана зі зміною біосинтетичної спроможності при електромагнітній обробці. Збільшення розмірів колоній відмічено у культур *Brevibacterium sp. 22* і *Bac. subtilis* шт. 316 М. У культури *Str. aureofaciens* шт. 019 спостерігалось збільшення в 1,5 рази кількості морфологічних варіантів з високою біосинтетичною активністю.

6. Обробка живильного середовища полем вказаних параметрів не призводить до підвищення біосинтезу, що показано на прикладі культивування *Bac. subtilis* шт. 316 М.

7. Показан активуючий вплив поля на ферменти: β -фруктофуранозідазу *Sacch. cerevisiae* раса XII, активність якої зростає на 28 % і лужної сериної протеїнази, ефект активації якої становить 35 і 55 % в залежності від рН буферного розчину. Оброблені препарати характеризуються підвищеною стабільністю при зберіганні.

8. Поле ЛІА впливає на фізико-хімічні властивості макромолекул. Для обробленого препарату лужної сериної протеїнази показано зміну ізоелектричної точки з рН 11,4-10,6 у контролі до рН 9,3-8,8. В 2 рази зросла гемаглютинуюча активність обробленого розчину препарату лектину, при цьому вуглеводна специфічність не виявляє якосної різниці з контрольним препаратом.

9. З використанням радіоізотопного методу показано, що електромагнітна обробка призводить до збільшення швидкості транспорту в клітині глюкози, поміченої по атому вуглецю. Для дріжджів *Sacch. cerevisiae* раса XII це збільшення складало 30%. Встановлена залежність між тривалістю дії поля і швидкістю постачання глюкози в клітини бактерій *Bac. subtilis* шт. 316 М.

10. Пропонується гіпотеза, згідно якій причинами збільшення біосинтетичної спроможності промислових продуцентів БАР полем ЛІА є активація ферментних систем клітин мікроорганізмів, що призводить до прискорення транспорту поживних речовин і створенню продуктів метаболізму. Припускається вплив електромагнітного поля на рідкокристалічний стан біомембран, швидкість біохімічних реакцій, фізичний стан макромолекул.

11. Розроблено спосіб електромагнітної стимуляції продуцентів біологічно активних речовин. Показана доцільність його використання в біотехнології, економічна ефективність, наявність екологічного ефекту.

12. Рекомендується використання способу електромагнітної стимуляції продуцентів для селекційної роботи з актиноміцетами на промислових підприємствах галузі. Ефективність селекційної роботи підвищується за рахунок збільшення імовірності отримання активних морфологічних варіантів.

Матеріали дисертації опубліковані в таких роботах:

1. Способ активации хлебопекарных дрожжей: А. с. 1592328 А1 СССР, МКИ С 12 N 1/18 / Пичко В. В., Ельциц С. В., Поваляева И. В. и др. - 15.09.90. - Бюл. N34.

2. Пичко В. В., Ельчиц С. В., Поваляева И. В. Влияние электромагнитных полей линейно-индукционного вращателя на активность клеток дрожжей // Разработка и внедрение вихревых электромагнитных аппаратов для интенсификации технологических процессов - АВС-89: Тез. докл. Всесоюз. конф. - Тамбов, 1989. - С. 41-42.

3. Ельчиц С. В., Пичко В. В., Поваляева И. В. Внедрение линейно-индукционного вращателя в технологические процессы микробиологических производств // Разработка и внедрение вихревых электромагнитных аппаратов для интенсификации технологических процессов - АВС-89: Тез. докл. Всесоюз. конф. - Тамбов, 1989. - С. 42-43.

4. Пичко В. В., Кудря В. А., Поваляева И. В. Стимуляция действия и биосинтеза ферментов электромагнитным полем // Методы получения, анализа и применения ферментов: Тез. докл. Всесоюз. конф. - Юрмала, 1990. - С. 89.

5. Электростимуляция продуцента хлортетрациклина / И. В. Поваляева, В. В. Пичко, Н. Я. Краснобрижий, Т. М. Бегаенко; Киев. Технол. ин-т пищ. пром-сти. - Киев, 1991. - 9 с. - Рус. - Деп. в УкрНИИТИ 13.05.91, N 663-Ук91.

6. Влияние переменного электромагнитного поля на активность продуцента эластотеразы / В. А. Кудря, В. В. Пичко, Н. В. Колтукова, И. В. Поваляева // Микробиологический журнал. - 1991. - Т. 53, N 2. - С. 28-32.

7. Поваляева И. В., Пичко В. В., Чугуй В. А. Получение глюкозоизомеразы с использованием электростимуляции продуцента // Разработка и внедрение высокоэффективных ресурсосберегающих технологий, оборудования и новых видов пищевых продуктов в пищевую и перерабатывающую отрасли АПК: Тез. докл. Республ. науч.-тех. конф. 24-26 сент. 1991 г. - Киев, 1991. - С. 125.

8. Поваляева И. В., Колтукова Н. В., Кудря В. А. Влияние электромагнитного поля на субтилизин *Bacillus subtilis* 316 М // Украинский биохимический журнал. - 1993. - Т. 65, N 1. - С. 104-106.

9. Изучение действия электромагнитного поля на щелочную сериновую протеиназу *Bacillus subtilis* / В. А. Кудря, В. В. Пичко, И. В. Поваляева, Н. В. Колтукова // Химия протеолитических ферментов: Тез. докл. симп. - Москва, 1993. - С. 123.

10. Поваляева И. В., Пичко В. В., Чугуй В. О. Активация продуцентов хлортетрациклину // Розробка та впровадження нових технологій та обладнання в харчову та переробну промисловість: Тез. докл. Міжнарод. науч.-тех. конф. 19-21 жовт. 1993 р. - Київ, 1993. - С.

AB 28.237

AB 28.237