

57
A-26

АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
АН ЛАТВИЙСКОЙ ССР

На правах рукописи

Ф. П. ЗИРИНЬ

ОБЛУЧЕННЫЕ ДРОЖЖИ
КАК ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ ВЕЩЕСТВ
С АНТИРАХИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель — доктор биологических наук В. П. Вендт

РИГА 1987

АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
АН ЛАТВИЙСКОЙ ССР

На правах рукописи

Ф. П. ЗИРИНЬ

ОБЛУЧЕННЫЕ ДРОЖЖИ
КАК ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ ВЕЩЕСТВ
С АНТИРАХИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель — доктор биологических наук В. П. Вендт

РИГА 1967

57
A26

СК

Работа выполнена в лаборатории биохимии и физиологии животных Института биологии АН Латвийской ССР, в лаборатории фотобиохимии Института биохимии АН Украинской ССР и в лаборатории Слокского целлюлозно-бумажного комбината Латвийской ССР.

Объединенный Ученый Совет Отделения химических и биологических наук Академии наук Латвийской ССР направляет вам для ознакомления автореферат диссертационной работы Ф. П. Зиринь на тему: «Облученные дрожжи как источник получения веществ с антирахиитической активностью», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Объем работы 137 страниц машинописи. В тексте 10 таблиц и 9 рисунков. В списке литературы приведено 279 работ, из них 84 отечественных авторов.

Защита намечается на 24.11.1967 г.

Автореферат разослан 10.11.1967 г.

Просим ознакомить специалистов с авторефератом и прислать отзывы в двух экземплярах с подписью, заверенной печатью учреждения, по адресу: г. Рига, ул. Тургенева, 19. Отделение химических и биологических наук АН Латвийской ССР.

Ученый секретарь Совета
кандидат сельскохозяйственных наук

(М. П. Зарубина)

М. Зарубина

294724

Центральная научная
БИБЛИОТЕКА
Академии наук Киргизской ССР

ВВЕДЕНИЕ

Подъем материального благосостояния народа нашей страны требует дальнейшего увеличения общественного поголовья скота при одновременном значительном повышении его продуктивности. Эта проблема тесно связана с полноценным кормлением сельскохозяйственных животных, в котором важную роль играют витамины. Действуя как биологические катализаторы в организме, витамины имеют большое значение в физиологических процессах. Витамины необходимы для нормальной жизнедеятельности животных, их развития и продуктивности, а также повышения устойчивости к различным заболеваниям.

Особое значение в кормлении сельскохозяйственных животных и птиц имеет витамин Д. В последнее время у нас, а также за границей для профилактики и лечения рахита у молодых животных, кроме спиртовых и масляных концентратов витаминов группы Д, широко практикуют применение облученных ультрафиолетовым светом дрожжей. Концентраты эргокальциферола в виде облученных дрожжей имеют много преимуществ по сравнению с жидкими концентратами; удобная транспортировка, длительная сохранность при хранении и простота дозированного примешивания к комбикормам. Но следует отметить, что производство дрожжевых препаратов витамина Д в настоящее время осуществляется еще в недостаточных количествах и не обеспечивает потребность животноводства в этом витамине. Для нужд животноводства необходимо довести производство облученных дрожжей к 1970 году до 6 тысяч тонн в год при условии содержания в них не менее 20 тысяч международных единиц витамина Д₂ в одном грамме дрожжей.

Несмотря на то, что в литературе имеется много данных по химическому составу дрожжей, их значению и использованию в народном хозяйстве, подробного биологического исследования кормовых дрожжей, как источника провитамина Д₂, еще не проведено. Так, отсутствуют исчерпывающие сведения о содержании эргостерина и других стероидов в клетках различных кормовых дрожжей, не изучен механизм превращения провитамина в витамин Д в процессе облучения

дрожжевых клеток ультрафиолетовым светом, нет данных о природе и биологическом действии фотодериватов, образующихся в результате облучения стеринов, весьма мало известно о возможности стимулирования биосинтеза эргостерина у дрожжей и т. д.

Целью наших исследований явилось уточнение следующих вопросов, связанных с биохимией образования и получения витамина D_2 при облучении дрожжей:

1. Изучить содержание эргостерина в дрожжах, выпускаемых предприятиями Латвийской ССР;
2. Исследовать стимулирующее действие уксусной кислоты на накопление эргостерина в дрожжевых клетках;
3. Выяснить возможность получения радиоактивного эргостерина и его фотодериватов при помощи меченого C^{14} ацетата;
4. Разработать оптимальный режим облучения кормовых дрожжей с целью получения концентрата витамина D_2 ;
5. Изучить состав неомыляемых веществ облученных и не облученных дрожжей при помощи тонкослойной хроматографии;
6. Проверить на цыплятах антирахитическую активность люминстерина и его окисленной формы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Содержание эргостерина в дрожжах, выпускаемых на предприятиях Латвийской ССР

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Количественное содержание эргостерина мы определили в трех рассах дрожжей — *Candida tropicalis*, *Torula utilis* и *Saccharomyces cerevisiae* по методике, описанной В. П. Вендетом, В. В. Белявской и З. М. Траудук в основе которой был положен колориметрический метод определения стеринов основанный на реакции Либермана—Бурхарда в модификации Мура и Баумана. Как исходный материал для анализов мы использовали дрожжевые суспензии кормовых дрожжей, а для анализов пекарских дрожжей их прессованную биомассу. Количественное содержание эргостерина в процентах рассчитывали на сухой вес дрожжевой биомассы. Определение сухого веса производилось высушиванием навески при температуре $105^{\circ}C$ до постоянного веса. Сухой вес высчитали как среднее арифметическое нескольких параллельных проб. Всего нами анализировались 15 образцов дрожжей (по пять образцов каждой культуры).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты анализов отражены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание эргостерина в разных образцах дрожжей

№№ опыта	Название дрожжевой культуры		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Torula utilis</i>
1	0,65%	0,28%	0,13%
2	0,68%	0,25%	0,15%
3	0,68%	0,34%	0,11%
4	0,75%	0,30%	0,12%
5	0,70%	0,29%	0,13%
Пределы колебаний содержания эргостерина в дрожжах	0,65—0,75%	0,25—0,34%	0,11—0,15%

Как видно из приведенных данных, больше всего эргостерина содержат пекарские дрожжи. Но, несмотря на высокую концентрацию эргостерина, эти дрожжи, по-видимому, не могут служить как перспективный источник для производства концентрата витамина D_2 , так как они относительно дорогие. Из кормовых дрожжей больше всего эргостерина содержится в культуре *Candida tropicalis*, в связи с чем они могут быть использованы в качестве источника для получения витаминного концентрата после облучения их ультрафиолетовой радиацией.

2. Влияние уксусной кислоты на биосинтез эргостерина в пекарских дрожжах

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Как известно, выход витамина D_2 в облученных дрожжах зависит от содержания в них провитамина. Поэтому целесообразно искать пути, при помощи которых можно было бы повысить накопление эргостерина в исходных дрожжах. Швенк и сотрудники показали, что биосинтез эргостерина протекает подобно синтезу холестерина и что в этом процессе важную роль играет уксусная кислота. Мы решили проверить действие уксусной кислоты на выход эргостерина, выращивая дрожжи в лабораторных условиях.

В основе питательной среды мы брали следующие

вещества (из расчета на один литр воды в граммах): сульфат аммония — 6,0, сульфат магния — 1,2, фосфат аммония (однозамещенный) — 1,5, хлористый калий — 1,3, глюкоза — 40. Неорганические соли сперва растворили в двухстах мл пивного сусла, а потом это количество жидкости довели до одного литра дистиллированной водой. В таком виде приготовленную питательную среду заливали в четыре стеклянные колбы емкостью 2,5 литра по одному литру в каждую. После того в каждую колбу вводили по два грамма прессованных пекарских дрожжей производства Киевского хлебокомбината с содержанием сухих веществ 25%. Одна колба служила контрольной, а в остальные три колбы дополнительно прибавляли химически чистую ледяную уксусную кислоту с таким расчетом, чтобы концентрация кислоты в каждой колбе составила соответственно 0,05, 0,1 и 0,2%. Величина pH исходной питательной среды составляла 5,5, а после прибавления кислоты 4,5 (кроме контрольной, в которой pH оставалось прежним). Колбы закрывались пробками, через которые проходили стеклянные барбатеры (по одному в каждой). Затем колбы помещались в металлическую ванну с водой. При помощи термостата ТС-24, обеспечивалась циркуляция воды и поддерживалась постоянная температура 34°C. Для подачи воздуха в колбы мы использовали компрессор, воздух которого очищался от пыли фильтром. Таким фильтром служила стеклянная колба емкостью в пять литров, в которую заливалась вода до 1/3 объема и которая была смонтирована по принципу промывалки. Ток воздуха от компрес-

сора через фильтр проходил через реометры, которые перед опытом калибровались с таким расчетом, чтобы через каждую колбу в единицу времени прошло одинаковое количество воздуха — в данном случае 5 литров/минуту. От реометров воздух проходил через барбатеры колб в питательную среду. Циркуляция воздуха и воды происходила через систему резиновых трубок. Принципиальная схема лабораторного устройства для выращивания дрожжей показана на рисунке 1. Время выращивания дрожжей продолжалось 20 часов. pH среды в колбах составлял 2,5. Дрожжевые суспензии центрифугировались, определялось содержание сырой биомассы, а также и содержание сухих веществ. Пробы омылялись, а в неомыляемых остатках определялось содержание эргостерина по методу, указанному выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменения сырой биомассы, сухих веществ, а также содержание эргостерина под влиянием уксусной кислоты приведено в таблице 2.

Таблица 2

Изменение концентрации биомассы и содержания эргостерина в пекарских дрожжах в зависимости от содержания уксусной кислоты

	Питательная среда без CH_3COOH (контроль)	Питательная среда с концентрацией CH_3COOH 0,05%	Питательная среда с концентрацией CH_3COOH 0,1%	Питательная среда с концентрацией CH_3COOH 0,2%
Содержание сырой биомассы в одном литре суспензии (гр)	32,50	29,79	27,57	24,73
Содержание сухих веществ в одном литре суспензии (гр)	6,78	6,52	6,38	5,36
Содержание эргостерина в % на сухой вес	0,24	0,32	0,34	0,38

Данные этой таблицы показывают, что присутствие уксусной кислоты в питательной среде, в которой выращиваются дрожжи, способствует усиленному биосинтезу эргостерина в дрожжевых клетках.

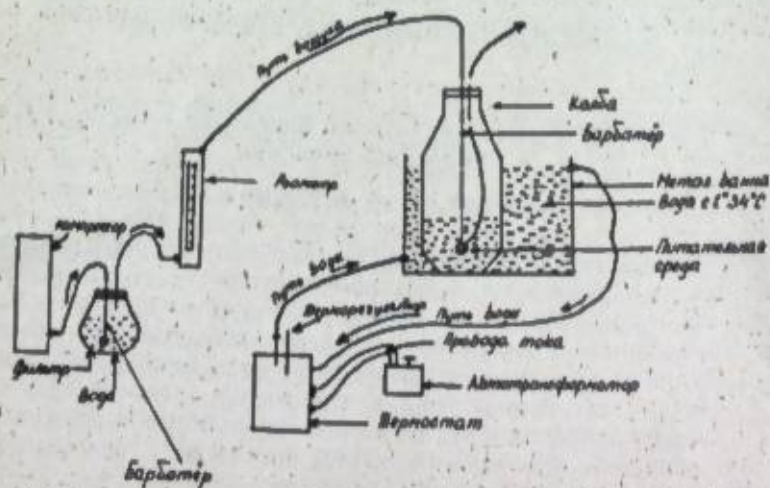


Рис. 1.

3. Получение эргостерина и продуктов его фотолиза меченного C^{14}

Несмотря на то, что со времени открытия витаминов группы Д прошло около 40 лет, вопрос об обмене витамина в живом организме еще полностью не решен. Для изучения механизма образования и превращения фотодериватов провитамина Д в организме животных, нам представилось интересным разработать биосинтетический метод получения препаратов эргостерина меченного C^{14} .

Для указанной цели мы в принципе использовали предыдущую методику, описанную выше. Разница заключается только в том, что на этот раз ограничились применением двух колб. Питательная среда осталась прежней, и в каждую колбу вводили по два грамма прессованных дрожжей — *Saccharomyces cerevisiae* производства Киевского хлебокомбината с содержанием сухих веществ 25%. Концентрация уксусной кислоты составляла в обеих колбах 0,2%. В качестве источника C^{14} мы использовали ацетат натрия, меченный в карбоксиле. Радиоактивный ацетат мы брали в виде раствора, один мл которого давал 16.500.000 импульсов/мин. Предыдущий опыт показал, что при выращивании дрожжей в наших условиях в течение 20 часов сырая биомасса дрожжей увеличивается с 2 г, заданных в начале опыта, до 25 г (в одном литре). Раствор меченного ацетата разбавлялся с таким расчетом, чтобы на один г сырой биомассы (полученной в конце выращивания) приходилось примерно 50.000 импульсов. Радиоактивный углекислый газ, образующийся во время выращивания дрожжей, поглощался 15% раствором едкого натрия. Во время опыта дрожжи росли хорошо и никакого воздействия, связанного с присутствием радиоактивного углерода, не наблюдалось. Через 20 часов дрожжи убивались повышением температуры до 80°C с экспозицией 30 минут. В том, что дрожжевые клетки действительно были убиты, мы убедились, просматривая их под микроскопом в присутствии раствора метиленового синего. В дальнейшем дрожжевая суспензия центрифугировалась и подвергалась омылению 10% спиртовым раствором едкого калия. Неомыляемый остаток после определения в нем эргостерина, содержание которого увеличивалось от 1% в исходных до 1,3% после выращивания, подвергался хроматографированию на пластинках, покрытых тонким слоем окиси алюминия, закрепленной гипсом. Локализованный на этих пластинках эргостерин извлекался спиртом. Спиртовый раствор отделялся от адсорбента центрифугированием, и в нем определялось на спектрофотометре — СФ-4 содержание эргостерина. Всего

было получено 6,6 мг. чистого меченного эргостерина, который в кварцевой трубке подвергался облучению ультрафиолетовым светом эритемной лампы с экспозицией 25 минут. Облученный раствор выпаривался в вакууме в атмосфере инертного газа досуха. Остаток растворялся в бензоле и наносился на хроматографическую пластинку, покрытую окисью алюминия, закрепленной гипсом и хроматографировался в растворе бензола с ацетоном (93:7). Контрольные пятна на хроматограмме проявлялись парами пятихлористой сурьмы, и при этом было обнаружено три пятна, соответствующих по Rf эргостерину, превитамину и люмистерину. Слои окиси алюминия, соответствующие положению всех трех пятен, раздельно изолировались с хроматографической пластинки и обрабатывались спиртом. После отделения окиси алюминия центрифугированием спиртовые растворы подвергались спектрофотометрическому анализу. В результате было установлено, что кривые поглощения веществ, извлеченных с хроматограммы, также соответствуют спектрам поглощения, эргостерина превитамина и люмистерина. После спектрофотометрирования каждый из исследуемых растворов наносился на мишень счетчика радиоактивности, спирт быстро удалялся струей углекислого газа, и определялась радиоактивность эргостерина и полученных из него фотодериватов. Радиоактивность полученных веществ определялась при помощи пересчетного устройства типа — Б-3 с счетчиком МСТ-17.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Измеряя радиоактивность полученных веществ, мы установили, что один мг вещества дает следующее количество импульсов/мин:

эргостерин	— 506
превитамина	— 1700
люмистерин	— 460

При применении меченного C^{14} ацетата натрия в процессе выращивания дрожжей, радиоактивный углерод включается в молекулу эргостерина, что затем дает возможность получить все его радиоактивные фотодериваты.

4. Разработка оптимального режима облучения дрожжей

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Эта часть работы была выполнена на Слоском целлюлозно-бумажном комбинате, который производит кормовые дрожжи культуры — *Candida tropicalis*. Нашей задачей

явилась уточнить, при каком режиме облучения возможно было получить концентрат витамина D_2 с наибольшей активностью. Определенный интерес представляло изучение влияния времени облучения и концентрации биомассы в дрожжевых суспензиях на выход витамина, при учете затраты электроэнергии. Облучение дрожжевых суспензий производилось в специальной облучательной аппаратуре, сконструированной в лаборатории фотобиохимии Института биохимии АН УССР. Принципиальная схема конструкции облучательного аппарата показана на рисунке 2. Количественное определение витамина D_2 в облученных дрожжах мы проводили по методике, описанной В. П. Вендом, В. В. Белявской и Н. Н. Говсеевой, использовавших метод определения витаминов Д, предложенный Чапке и Плесснигом, основанный на колориметриче-

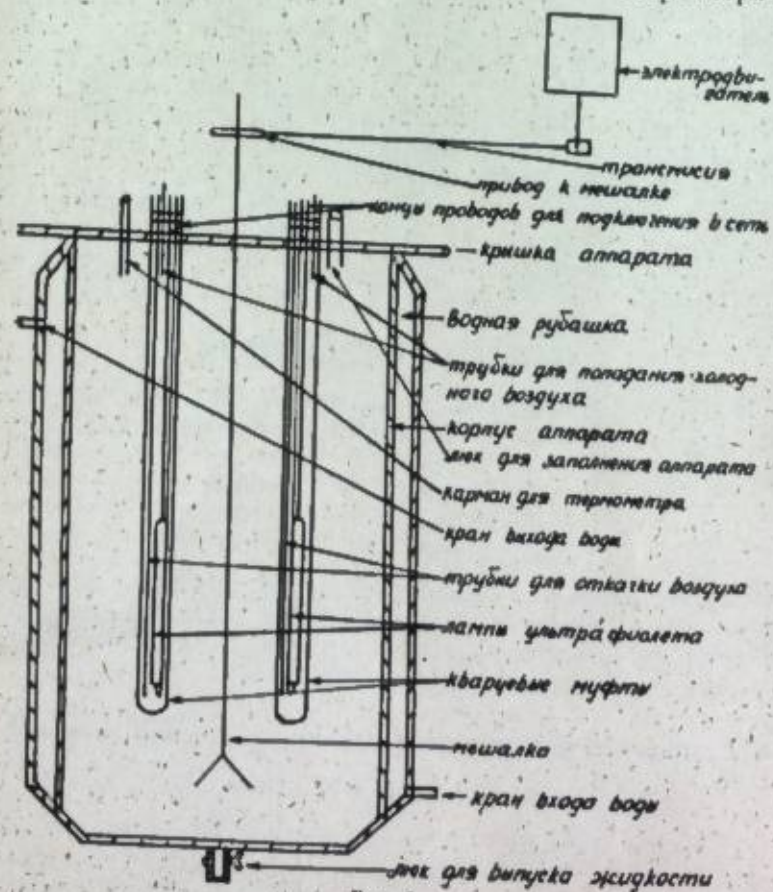


Рис. 2.

ской реакции указанных витаминов с двуххлористым оловом. Исходным материалом для анализов служили дрожжевые суспензии после облучения их ультрафиолетовой радиацией при температуре не выше $35^{\circ}C$ в облучательном аппарате емкостью 35 литров, снабженном двумя лампами типа ПРК-2. Содержание эргостерина в исходных дрожжах составило 0,28% в расчете на сухой вес.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выход витамина D_2 в зависимости от времени облучения и содержания биомассы в суспензии приведены в таблице 3, а расход электроэнергии — в таблице 4.

Таблица 3
Количество витамина D_2 , выраженное в миллионах и. е. в одном килограмме, облученных при разном режиме дрожжей

Время облучения в минутах	Концентрация биомассы в дрожжевых суспензиях в %			
	10%	5%	2,5%	1,25%
20	1,02	6,98	13,20	13,80
40	2,50	11,10	30,10	29,50
50	4,00	12,30	30,20	29,90
60	5,60	14,00	31,50	32,00

Таблица 4
Расход электроэнергии в киловаттах на образование одного миллиона международных единиц витамина D_2 , получаемого при облучении суспензии дрожжей при разном режиме

Время облучения в минутах	Концентрация биомассы в суспензии в %			
	10%	5%	2,5%	1,25%
20	0,175	0,070	0,064	0,063
40	0,112	0,055	0,041	0,040
50	0,089	0,058	0,044	0,042
60	0,095	0,060	0,046	0,044

Как видно из приведенных таблиц, наилучшей концентрацией биомассы следует считать 1,25—2,50%. В таком виде облученные суспензии с экспозицией ультрафиолетовой

радиации 40—50 минут дают возможность получить концентрат витамина Д₂ с активностью не меньше 30.000 и. е. в одном грамме сухих дрожжей при минимальных затратах электроэнергии.

5. Изучение состава неомыляемых веществ облученных и необлученных дрожжей

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Как было доказано Виндаусом еще в тридцатых годах, в процессе фотолиза эргостерина образуется не только эргокальциферол, но и другие фотодериваты, которые являются его фотонизомерами. Целью наших исследований явилось уточнение состава неомыляемых веществ дрожжей до и после облучения. Исследования проводились на культуре дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Для этой цели 1,5% суспензии дрожжей облучались в течение двух часов в облучательном аппарате, сконструированном в лаборатории фотобиохимии Института биохимии АН УССР емкостью 15 литров и снабженным двумя ультрафиолетовыми лампами типа ПРК-4. Для анализов отбирались следующие пробы: исходная — до облучения, через 1,5 и 2 часа облучения. Для омыления брали по 400 мл дрожжевой суспензии. После центрифугирования сырая биомасса проб омылялась в присутствии 250 мл 10% спиртового раствора едкого калия. Неомыляемые остатки всех трех проб растворялись в 10 мл бензола, и полученные растворы при помощи микропипетки наносились на хроматографическую пластинку, покрытую тонким слоем окиси алюминия, закрепленного гипсом, на пять стартовых точек, две из которых по обоням краям пластинки предназначались для получения контрольных хроматограмм, а остальные три для получения хроматограмм, при помощи которых предполагалось исследовать фотодериваты. Пластинки с нанесенными пробами помещались в стеклянные хроматографические камеры под углом 30—40°, на дно которых предварительно наливался растворитель, состоящий из бензола и ацетона (95:5). Камера наполнялась углекислым газом, закрывалась и ставилась в темное место. Когда фронт растворителя приближался к краю пластинки (1—2 см), последняя вынималась из камеры и высушивалась струей углекислого газа. После этого хроматограммы проявились парами пятихлористой сурьмы. Проявленные «пятна» контрольных хроматограмм служили ориентирами для нахождения непроявленных «пятен» исследуемого раствора. Для количественного определения разделен-

ных хроматографическим путем продуктов снимали полоску адсорбента, соответствующую каждому контрольному «пятну», взвешивали, засыпали в центрифужную пробирку, заливали пятью мл этанола, центрифугировали, и раствор над осадками подвергали исследованию на спектрофотометре СФ-4 в ультрафиолетовой области спектра.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как видно из схемы хроматограммы, которая приведена на рисунке 3, в исходных дрожжах до их облучения нам удалось обнаружить всего четыре «пятна». Первое «пятно» (старт), где могли остаться какие-либо продукты окисления.

Не облученные дрожжи	Облученные дрожжи	
	Экспозиция облучения 1,5 часа	Экспозиция облучения 2 часа
	Фронт	
4 ○	7. ○ 6. ○ 5. ○ 4. ○ 3. ○	6. ○ 5. ○ 4. ○ 3. ○
3. ○	2. ○	2. ○
2. ○	1. ○	1. ○
1. ○	С т а р т	

Обозначения

- | | | |
|---------------------------------|---|-----------------------------|
| 1. старт | 1. старт | 1. старт |
| 2. эргостерин | 2. эргостерин | 2. эргостерин |
| 3. вещество неизвестной природы | 3. эргокальциферол | 3. эргокальциферол |
| 4. стеринаподобное вещество | 4. тахистерин | 4. тахистерин |
| | 5. продукты окисления тахистерина (не выделены по выделенной пробы) | 5. псевдотакстерин |
| | 6. псевдотакстерин | 6. стеринаподобное вещество |
| | 7. стеринаподобное вещество | |

Рис. 3.

Второе «пятно» содержало эргостерин, третье — вещество неизвестной природы, а четвертое — стериноподобное вещество.

Хроматограмма дрожжей, облученных 1,5 часа, содержала семь «пятен». Вещества, которые остались в первом — стартовом «пятне», имеют максимум поглощения при 250 мкм. Второе «пятно» содержало непревращенный эргостерин с тремя характерными максимумами поглощения при длине волны 271,5, 282 и 293 мкм. В третьем «пятне» находился витамин D₂, максимум которого определен при длине волны 265 мкм. В четвертом «пятне» определялось вещество с большим поглощением при длине волны 290 мкм, возможно, оно является тахистеринном, который может образоваться из пре-витамина и имеет максимум в этой области. Природа пятого «пятна» еще точно не выяснена, но, возможно, что это продукт окисления тахистерина, так как он имеет максимум поглощения в области 285 мкм. Шестое «пятно» содержало превитамин, а седьмое — то же стериноподобное вещество, которое имеется в необлученных дрожжах.

Хроматограмма неомыляемых веществ дрожжей, облученных в течение двух часов, включает шесть «пятен». Первое «пятно» (старт) содержало продукты окисления, второе — эргостерин, а третье — эргокальциферол в относительно больших количествах. В четвертом «пятне» обнаружено вещество, которое имеет максимум поглощения в области 272 мкм, характерный для люмистерина. Пятое «пятно» идентифицировано как превитамин, а в шестом «пятне» найдено то же самое вещество, которое совпадает по Rf и характеру кривой спектра с четвертым «пятном» дрожжей необлученных и седьмым «пятном» облученных 1,5 часа.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что количество и состав веществ при облучении дрожжей зависят от времени облучения дрожжевых суспензий.

При помощи тонкослойной хроматографии фотодериваты эргостерина могут быть выделены в чистом виде, что дает возможность проверить их биологическую активность на живом организме.

6. Проверка антирахитической активности люмистерина и его оксида на цыплятах

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для исследования брались однодневные цыплята породы белый леггорн. Цыплята размещались в клетках с искусственным освещением без доступа ультрафиолетовой радиации

по 10 цыплят в группе. Распределение цыплят по группам проводилось по методу аналогов на основе вариаций в живом весе с таким расчетом, чтобы колебания среднего веса между группами не превышало ± 1 г. Было проведено две серии опытов по следующей схеме:

Первая серия опытов

1. группа получала основной рацион
2. группа " " " + витамин D₂
3. группа " " " + люмистерин
4. группа " " " + оксилюмистерин

Во второй серии опытов, помимо этих 4 групп, была создана еще 5-я, цыплята которой к основному рациону получали добавку облученных пекарских дрожжей.

Состав основного корма

кукурузная мука	— 30%
ячменная мука	— 20%
овсяная мука	— 16%
соевый шрот	— 15%
подсолнечниковый шрот	— 10%
казеин	— 5%
дрожжи	— 2,5%
соль поваренная	— 0,75%
мел	— 0,75%
марганец сернистый	— 0,02%
витамин А	— 800 и.е. на 100 г корма.

Этот рацион содержит 0,55% кальция и 0,49% фосфора.

Цыплята имели постоянный доступ к основному корму и воде. Добавки различных стериннов — витамина D₂, люмистерина и его оксида задавались перорально с помощью калиброванного шприца в 0,1 мл разогретого свиного сала в дозе 40 γ на 1 голову через каждые три дня. Облученные пекарские дрожжи также вводились перорально в количестве 0,069 г с активностью, соответствующей 40 γ эргокальциферола. Цыплята контрольной группы и группы с добавкой дрожжей получали сало без стериннов.

Указанные препараты начали задаваться на третий день жизни цыплят. Опыт продолжался двадцать дней.

В начале и конце опытного периода цыплята индивидуально взвешивались. В конце опыта при забое проводился сбор крови (по группам) и у каждого цыпленка бралась правая большая берцовая кость.

В сыворотке крови определялись следующие показатели: кальций, по методу трилометрического титрования, неорганический фосфор, по методу Тауски и Шора, а активность щелочной фосфатазы по методу Моцко и Уайна.

Большая берцовая кость после очистки от мышц высушивалась 24 часа при 105°C, затем обезжиривалась в бензине 5 суток и снова высушивалась. Сухие обезжиренные кости измельчались, и в костном порошке (по группам) определялось количество минеральных веществ путем озольнения в муфельной печи. Определялась также концентрация лимонной кислоты по методу Рейфера в кислом экстракте костей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные взвешивания цыплят приведены в таблице 5, биохимические показатели анализа сыворотки — в таблице 6, а содержание золы и лимонной кислоты — в таблице 7.

Таблица 5
Живой вес и привесы опытных цыплят за 20 дней

Опытные группы	Первая серия опытов				Вторая серия опытов			
	начальный вес, г	конечный вес, г	Привес		начальный вес, г	конечный вес, г	Привес	
			г (M±μ)	%			г (M±μ)	%
1. Основной корм	52,7	121,8	69,1±6,9	100	43,4	110,9	67,5±3,1	100
2. Основной корм + витамин Д ₂	53,0	158,1	105,1±9,4	152	44,3	140,9	96,6±3,9	143,1
3. Основной корм + люминестерин	53,6	151,2	97,6±6,9	141,2	44,4	153,2	108,8±3,8	161,1
4. Основной корм + оксилюминестерин	53,7	150,5	102,8±6,6	148,7	44,0	127,6	83,6±4,7	123,8
5. Основной корм + облученные дрожжи	—	—	—	—	43,9	163,2	119,3±4,1	176,7

Разница между опытными группами по живому весу была статистически достоверной (p<0,01).

Таблица 6

Биохимические показатели сыворотки крови цыплят

Опытные группы	Первая серия опытов			Вторая серия опытов		
	кальций мг %	неорг. фосфор мг %	щелочная фосфатаза в ед.	кальций мг %	неорг. фосфор мг %	щелочная фосфатаза в ед.
1. Основной корм	8,9	4,8	93	8,0	5,0	104
2. Основной корм + витамин Д ₂	11,1	8,4	23	10,9	6,4	35
3. Основной корм + люминестерин	11,1	8,1	27	10,9	6,3	38
4. Основной корм + оксилюминестерин	10,8	7,0	48	8,4	5,8	95
5. Основной корм + облученные дрожжи	—	—	—	10,9	6,5	36

Таблица 7.

Содержание золы и лимонной кислоты в костях

Опытные группы	Первая серия опытов		Вторая серия опытов	
	зола %	лимонная кислота %	зола %	лимонная кислота %
1. Основной рацион	27,8	0,39	24,8	0,36
2. Основной рацион + витамин Д ₂	37,3	0,65	32,3	0,58
3. Основной рацион + люминестерин	37,5	0,65	31,8	0,56
4. Основной рацион + оксилюминестерин	36,2	0,58	27,6	0,39
5. Основной рацион + облученные дрожжи	—	—	32,5	0,60

Как видно из приведенных данных, люминестерин в дозе равной количеству эргокальциферола, предохраняет цыплят от заболевания рахитом. Его оксид тоже проявляет некоторое антирахитическое действие, но более слабое по сравнению с витамином Д₂ и люминестерином. Для полного уточнения вопроса о действии оксилюминестерина следует провести дополнительные исследования. Облученные дрожжи предохраняют цыплят от заболевания рахитом, кроме того, по

294724

Центральная научная
БИБЛИОТЕКА
Академии наук Кыргызской ССР

сравнению с эргокальциферолом проявляют дополнительное стимулирующее рост действие. Это можно объяснить тем, что в процессе фотоллиза эргостерина образуются также и другие биологически активные вещества, например, люмистерин, которые благоприятно влияют на рост и развитие цыплят.

Поскольку облученные дрожжи задавались в ничтожных количествах (0,069 г на голову, один раз в три дня), то они не могли существенно изменить баланс витаминов группы В или других активных веществ, получаемых цыплятами в основном корме с необлученными дрожжами, количество которых было в 30 раз больше.

Можно полагать, что одним из важнейших биологически активных продуктов, образующихся в дрожжах при облучении, является люмистерин, который и обусловил дополнительный стимулирующий рост эффект, облученных дрожжей в нашем опыте на цыплятах.

ВЫВОДЫ

1. Из кормовых дрожжей, выпускаемых на предприятиях Латвийской ССР, наибольшее количество эргостерина содержат дрожжи расы *Candida tropicalis* производства Слокского ЦБК. Экспериментально доказано, что эти дрожжи могут быть использованы в качестве источника получения концентрата витамина D_2 .

2. Присутствие уксусной кислоты в питательной среде при выращивании дрожжей способствует накоплению эргостерина в их клетках. Установлено, что добавление уксусной кислоты к питательной среде в концентрации 0,05, 0,1 и 0,2% увеличивает содержание эргостерина в биомассе дрожжей соответственно на 30, 40 и 58%.

3. В опыте с применением ацетата натрия, меченого радиоуглерода C^{14} , установлено, что радиоактивная метка включается в молекулу эргостерина. Это дает возможность получить после ультрафиолетового облучения спиртового раствора меченого провитамина все его фотодериваты, меченные по углероду.

4. Разработан оптимальный технологический режим облучения Слокских дрожжей для получения концентрата витамина D_2 . Наилучшей концентрацией биомассы в суспензиях оказалась концентрация 1,25—2,5%. При облучении такой суспензии с экспозицией ультрафиолетовой радиации 40—50 минут выход витамина D_2 составляет не меньше 30.000 и.е. на один грамм сухих дрожжей.

5. При помощи методов тонкослойной хроматографии и спектрофотометрического анализа установлено, что в необлученных дрожжах имеется три, а в облученных — семь веществ стероидной природы. Количество и характер этих веществ в облученных дрожжах зависит от режима облучения, от источника ультрафиолетовой радиации и экспозиции облучения. Из этих веществ мы идентифицировали присутствие в больших количествах люмистерина и его оксида, биологическая активность которых подвергалась исследованию на цыплятах.

6. Цыплята, получавшие добавки люмистерина, так же как и эргокальциферола, из расчета 40 μ веществ на голову один раз в три дня, не заболели рахитом при содержании их в течение 20 дней на рахитогенной диете.

7. Окслюмистерин в таких же дозировках значительно ослабил проявление рахита, но не способен был предупредить его развитие, в опытах на фоне острого рахита у контрольной группы.

8. Облученные пекарские дрожжи, помимо антирахитического действия, обладают дополнительным ростостимулирующим действием по сравнению с препаратом эргокальциферола.

СПИСОК РАБОТ, В КОТОРЫХ ОПУБЛИКОВАНЫ МАТЕРИАЛЫ ДИССЕРТАЦИИ

1. В. П. Вендт, В. В. Белявская, З. М. Даценко, Б. Д. Добшинска, Ф. П. Зиринь, О. Е. Мериквас — Новые данные по фотопревращению провитаминов Д в витамины *in vivo*. I. Укр. биох. съезд тез. доповідей (10—16 червня) Чернівці, 1965 г.

2. В. В. Белявская, Ф. П. Зиринь — О получении концентратов витамина D_2 облучением дрожжей. Прикладная биохимия и микробиология, т. II, вып. 4. Издат. «Наука» 1966 г., стр. 484.

3. Ф. П. Зиринь — Содержание эргостерина в дрожжах, выпускаемых на предприятиях Латвийской ССР. «Известия» АН Латв. ССР 1967, 1, 140.

4. Ф. П. Зиринь — Сравнительная оценка биологического действия эргокальциферола и облученных дрожжей. «Известия» АН Латв. ССР 1967, 2, 109.

Сдано в набор 18 августа 1967 г. Подписано в печать 5 сентября 1967 г. Формат
бумаги 60x84¹/₁₆. Объем 1,00 физ. лист. Тираж 250 экз. Заказ № 1861. Бесплатно.
ЯУ 24641. Отпечатано в типографии № 1 «Цинна» Управления полиграфической про-
мышленности Комитета по печати Совета Министров Латвийской ССР, г. Рига,
ул. Блауная, 38/40.