

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут біохімії ім.О.В.Палладіна

На правах рукопису

КРИЧКОВСЬКА ЛІДІЯ ВАСИЛІВНА

УДК 665.3:547.979.8

**Створення біологічно-активних продуктів
на основі стабілізованого каротину
біотехнологічного походження**

03.00.20-біотехнологія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук**

КИЇВ-2003

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Харківському національному технічному університеті "ХПТ" та Харківському державному медичному університеті.

Наукові консультанти:

доктор біологічних наук,
член-кор. НАН України
Донченко Георгій Вікторович,
зав. відділу біохімії коферментів
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
НАН України;

доктор біологічних наук, професор
Жуков Віктор Іванович,
зав. кафедри медичної біохімії
Харківського державного медичного університету
МОЗ України ;

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Курдиш Іван Кирилович,
зав. відділу мікробіологічних процесів
на твердих поверхнях Інституту
мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного
НАН України;

доктор біологічних наук, професор,
академік АН вищої школи
Каліман Павло Авксентійович,
професор кафедри біохімії Харківського національного
університету ім. В.Н. Каразіна МОН України;

доктор сільськогосподарських наук, професор
Шеремета Віктор Іванович,
зав. кафедри генетики тварин та біотехнології
Національного аграрного університету
Кабінету Міністрів України.

Провідна установа: - Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, відділ № 9 (м. Київ).

Захист відбудеться " 22. " грудня 2003р. о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна за адресою: 01601, м. Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України за адресою: Київ, вул. Леонтовича, 9.

Автореферат розіслано 20 листопада 2003 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

О.В. Кірсенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми Каротиноїди є найбільш розповсюдженою, багаточисельною та важливою групою природних пігментів у рослинному та тваринному світах. З більш ніж 600 відомих на сьогодні каротиноїдів лише біля 50 відносяться до провітаміну А. Активність вітаміну А мають ті каротиноїди, до складу молекул яких входить кільце β -іонуна (3,4-дегідроіонуна), зв'язане з аліфатичним ланцюгом, який містить систему супряжених подвійних зв'язків. Серед каротиноїдів найбільшу біологічну активність має β -каротин, який має два β -іононових кільця. Вважається, що крім найбільш вивченої функції як провітаміну А, каротиноїди самі по собі виконують захисні функції при дії вільних радикалів та ліпідних пероксидів, які руйнують клітинні мембрани, а також виконують роль неспецифічних активаторів імунної відповіді в організмі. Існують багаточисельні дані про участь каротиноїдів у клітинній диференціації, процесах росту. На сьогодні відомо про ендогенну та екзогенну антиоксидантну властивість каротиноїдів. В цій якості каротиноїди здатні знижувати не тільки пошкодження, індуковане різними зовнішніми генотоксинами, але й можуть бути засобами хіміопрофілактики розвитку пухлин [Сергеев А.В., 1992; Britton G, 1995 та інш.].

Основною сировиною для одержання каротину є морква, гарбуз, обліпиха, люцерна, але сучасні успіхи біотехнології дозволяють в значній мірі вирішувати проблеми виробництва каротину з іншої джерел. Каротиноїди містяться у багатьох мукорових грибах, для деяких видів яких характерен зверхсинтез і вони використовуються для промислового одержання каротину. Для мікробіологічного одержання каротину особливий інтерес викликають гетероталічні гриби порядку *Mikorales: Phycomyces blakesleanus* і *Blakeslea trispora*. Каротиноїди промислового біотехнологічного препарату з *Blakeslea trispora* представлені на 90% β -каротином і на 10% - α , - γ - каротинами та лікопіном [Колот Е.Н. и др., 1972; Eugster C., 1995; Кунщикова И.С., 2002 та інш.].

До теперішнього часу каротин, одержаний при культивуванні *Blakeslea trispora*, використовувався як харчовий продукт для забарвлення масла, маргарину, сиру, морозива і в невеликій кількості як вітамінний додаток в продуктах харчування. Продукти з каротином з тривалими термінами зберігання були відсутні внаслідок дуже швидкого окислення каротину по центральній та периферійним подвійним зв'язкам в присутності світла та тепла із зміною основних фізико-хімічних показників та утратою біологічних властивостей при окисленні 50% каротиноїдів. Окислення каротину має вільно-радикальний характер. Досі не знайдено ефективних методів стабілізації каротину від деструктивного руйнування, що не дає можливості застосовувати його в фармацевтичній промисловості для створення на його основі нових лікарських препаратів з лікувально-профілактичною дією [Батурін О.К., та інш., 1991; Болеева Л.З., 1994; James A. 1995]. Вирішення проблеми захисту каротину біотехнологічного походження на жирових основах від деструктивного руйнування внаслідок окислення відкриває широкі можливості для розробки нових фармацевтичних, харчових та

інших продуктів з каротином, розширення сфери його застосування та збільшення промислового виробництва каротину мікробіологічного з біомаси мукового гриба *Blakeslea trispora* в Україні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами науково-дослідних робіт.

Робота виконувалась згідно з постановою ДКНТ СРСР №245 від 13.06.80 “Розробити методи синтезу штучних аналогів олії обліпихи, наближених за своїми показниками до натуральної”, комплексним проектом КП НТП СЕВ (міжнародний проект “Нові рослини”), постановою ДКНТ від 25.05.90 “Створити нові форми лікарських та ефіроолійних рослин з використанням біотехнологічних методів для отримання біологічно активних речовин, тема 0193U027853 від 21.03.91 “Обґрунтування науково-практичних положень застосування нових ліпідів з антиоксидантними властивостями при розробці ліків з профілактичною дією”, постановою ДКНТ №110 від 14.07.94 “Розробити біологічно-активний препарат з антисептичними та антиоксидантними властивостями на основі рослинної ефіро-олійної сировини”; в рамках республіканської програми “Розробка складу та технології отримання лікувально-профілактичних препаратів на основі рослинної олії” 1994-2001гг., 0100U001088 від 13.01.99; “Наукове обґрунтування протиокиснювальної дії фенольних антиоксидантів у відношенні до каротиноїдів біотехнологічного походження”, 0102U000948 від 29.05.01 (наказ №422). Комплекс робіт виконано на базі Державного медичного університету та Національного технічного університету “ХПІ”. Впровадження результатів роботи здійснено за госпдоговірною тематикою: тема №48320 від 27.03.86р. “Фізико-хімічні дослідження структури та якості препарату “Аскол” та впровадження його у виробництво”; №48196 від 8.12.87р. “Дослідження питання розширення показників застосування “Асколу” та створення нової лікарської форми”; №48629 від 21.09.89р. “Проведення НДР по розробці та впровадженню у виробництво супозиторіїв на основі “Асколу”; №48319 від 17.02.94р. “Експериментальне обґрунтування розширення дії “Асколу” як профілактичного засобу при виразковій хворобі”, та рішенням Іноваційного фонду України про впровадження “Асколу” у виробництво в Україні (постанова від 6.04.94 р.). Всі роботи виконано під науковим керівництвом і за безпосередньою участю автора дисертації.

Мета та задачі дослідження. Головна мета роботи – розробка прийомів стабілізації каротину мікробіологічного за допомогою природних та синтетичних фенольних антиоксидантів від окислювальної деструкції з метою збільшення терміну збереження його фізико-хімічної структури та біологічної активності для розробки нових ефективних каротинвмісних лікарських засобів та інших продуктів, які раніш не виготовлялись.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано такі основні завдання:

- 1) вивчити регулюючий вплив складу культурального середовища (під впливом мікроелементів, вітамінів, антиоксидантів та прооксидантів) на ліпидоутворення та каротиногенез біомасою мікрогрибу *Blakeslea trispora* (штамм 940 /-/- 64/+/-).

- 2) із використанням штамму 940/-/ 64/+/- дослідити вплив домішок, внесених до культурального середовища, на стабілізацію мікробіологічного каротину від окислення,
- 3) теоретично та експериментально обґрунтувати універсальність вибору природних та синтетичних антиоксидантів для захисту каротину мікробіологічного на різних жирних основах від окислювального руйнування для збільшення терміну його збереження,
- 4) дослідити дію нових перспективних антиоксидантів для стабілізації каротинвмісних лікарських засобів,
- 5) вивчити на різних моделях патологій збереження специфічної лікувальної дії стабілізованого мікробіологічного каротину після 2-х років збереження: ранозагоюючий та протизапальний ефект при травмах, перекисне окислення ліпідів за умов стресу різного походження (больовий, електрострумний, травматичний) по рівню ТБК активних продуктів: (малонного діальдегіда в крові, мозку, печінці, слизових оболонках), дієвих кон'югатів, склад фосfolіпідів тканин мозку щурів за умов стресу, рівень активності супероксиддисмутази (СОД), рівню імунізації при ранах різного походження, гормонального стану тварин різного віку та інше,
- б) на основі стабілізованого каротину біотехнологічного походження розробити склад та технологію виготовлення лікарських засобів на різних жирних основах, вивчити терапевтичну активність нових препаратів при тривалому збереженні в експериментах на тваринах на різних моделях захворювань, провести вивчення їх нешкідливості.

Об'єкт дослідження каротин з біомаси мікрогриба *Blakeslea trispora* (штам 940/-/ -64/+/-).

Предмет дослідження – динаміка каротиногенезу, ліпідоутворення при дії різних факторів під час культивування біомаси; показники окислення каротину та ліпофільних сполук, умови стабілізації каротину, характеристика нових каротинвмісних продуктів.

Методи дослідження – культивування біомаси *Blakeslea trispora* при дії різних факторів, фізико-хімічні методи визначення ступеня окислення каротину та ліпофільних сполук, біохімічні методи визначення ПОЛ при різних патологіях під впливом нових каротинвмісних препаратів.

Наукова новизна одержаних результатів: Обґрунтовано використання біологічно-активних речовин (мікроелементів, вітамінів В₁, В₂, К₃), антиоксидантів (бутилокситолуол, фенозанова кислота), прооксидантів (KMnO₄, H₂O₂), для регулювання ліпідоутворення і нарощування біомаси *Blakeslea trispora* та каротиногенезу.

Досліджено вплив різних умов культивування біомаси *Blakeslea trispora* (внесення в середовище культивування ненасичених жирних кислот, зміна умов осмосу внесенням деяких мікроелементів, насичення середовища культивування вітамінами) на окислення каротину мікробіологічного та жирнокислотний склад.

Встановлена протіокислювальна активність природних антиоксидантів (α-токоферол,

2-метил-1,4-нафтохінон, β -аланін-*L*-гістидин /карнозин/) при сумісному введенні з фенольними стабілізаторами (бутилокситолуол, фенозанова кислота та інші) щодо каротину мікробіологічного на основі рослинних олій.

Визначено, що досліджена група антиоксидантів при певному дозовому співвідношенні не тільки стабілізує мікробіологічний каротин з біомаси мушкетарського гриба, але і захищає від окислення жирів основи для нього.

Вперше доведено, що застосована група антиоксидантів (α -токоферол, 2-метил-1,4-нафтохінон, бутилокситолуол) проявляє свою дію як синергисти в стабілізації складної полівітамінної олійної системи, що дозволяє збільшити термін збереження мікробіологічного каротину з 6-ти місяців до 2 та більше років.

Доведено, що стабілізація каротину можлива не тільки в рослинних оліях, але й в твердих жирах при застосуванні запропонованої синергетично діючої групи антиоксидантів, встановлені стехіометричні коефіцієнти антиоксидантів у жирах, що дозволяє обґрунтовано вибирати жирів основу як носія каротинвмісної лікарської форми.

Вперше доведено збереження специфічної лікувальної дії стабілізованого каротину мікробіологічного походження (після 2 років збереження) на моделях виразкової хвороби шлунку та інших патологіях (запалення, рани, травми та іш.) на прикладі процесів пероксидного окислення ліпідів в різних органах та тканинах по накопиченню ТБК – активних продуктів, дієвих кон'югатів (ДК), ферментативну (на прикладі процесів СРО) та неферментативну системи антиоксидантного захисту, рівню мітохондріального білка, тощо.

Показана синергетична дія стабілізованого каротину та природного антиоксиданту карнозину при корекції біохімічних порушень в організмі (неферментативна регуляція перекисного окислення ліпідів, накопичення фосфоліпідів, холестерину) при стресах, ранах, та на моделях різних захворювань.

Практичне значення одержаних результатів:

1. Встановлено, що виготовлений біотехнологічним методом мікробіологічний каротин із терміном зберігання 6 місяців можна при застосуванні антиоксидантів вводити у тверді жири, емульсії типу о/в, олійні розчини із збільшенням терміну зберігання каротину в них до 2-3 років.

2. В умовах промислового виробництва вітамінних заводів в Україні та Росії впроваджена технологія виготовлення каротинвмістивного засобу на основі рослинної олії, який за специфічною ефективністю аналогічний природним каротинвмістивним оліям і застосовується для лікування гастроентерологічних, проктологічних та інших захворювань, пов'язаних з ураженням слизових оболонок та відповідає вимогам Фармакологічного комітету України.

3. На основі стабілізованого каротину мікробіологічного з біомаси мушкетарського грибу *Blakeslea trispora* розроблено:

-склад, нормативно-технічну документацію - ТФС 42-1682-95, промислові та пускові регламенти на каротинвмістивний засіб на основі рослинної олії -“Аскол” (рег. №87/295/3); випуск за розробленою технологією розпочато у 1988 році на ХФЗ “Башбіофарм” (м.Уфа, Росія), за рішенням Іноваційного

фонду України в 1994 році на ХФЗ “Червона зірка” (м.Харків, Україна), та на МП “Технолог” (м.Умань, Україна);

-склад, нормативно-технічну документацію -ТФС 42-2032-90, промисловий регламент на каротинвмістний емульсійний засіб “Гіпозоль-А” в аерозольній формі для лікування інфікованих ран та хірургічних ускладнень (рег. №91/146/6); випуск розпочато у 1998 році на МП при ХФЗ “Здоров’є трудящих” (м.Харків, Україна); ПО “Алтайвітаміни (м.Бійск, Росія);

-склад та технологію виготовлення каротинвмісного засобу “Капсекол” (ТФС 42-У..) у м’яких желатинових капсулах для лікування гастроентерологічних захворювань. Нормативно-технічна документація на засіб розглянута комісією Фармкомітету України, отримано дозвіл на клінічні випробування;

-склад та технологію виготовлення каротинвмісного засобу на основі твердих жирів- супозиторії “Вітакол” та “Каровітал”, НТД на засіб подана на розгляд до Фармкомітету України;

-склад та технологічну інструкцію щодо промислового випуску продуктів бісквітної промисловості (вафлів з жировою начинкою з каротином та ефірною олією з подовженим терміном зберігання, дослідна партія виготовлена на Харківській бісквітній фабриці), отримано позитивне рішення Укркондитерпрому;

-склад парфюмерного засобу -зубної пасти з каротином - з лікувальною профілактичною дією для лікування пародонтозу, проведено клінічне випробування на базі стоматологічного інституту (м.Одеса).

4. Розроблено модифікацію методики одночасного аналізу жиророзчинних компонентів каротинвмістних олійних препаратів з використанням високоефективної рідинної хроматографії та модифікованих розрахунків спектрофотометричного аналізу багатоконпонентних полівітамінних систем.

Вирогідність наукових результатів експериментальних досліджень в лабораторних та виробничих умовах підтверджується статистичною обробкою даних та ефективним впровадженням результатів роботи на підприємствах України та Росії, рішеннями Фармкомітету України про клінічні випробування нових препаратів.

Особистий науковий внесок здобувача: Основні ідеї праці висунуті автором самостійно. В роботах, що опубліковані у співавторстві, відображені результати виконаних під науковим керівництвом і при особистій участі автора вказаних в авторефераті праць. В них автору належать: постановка задач, шляхів і методів їх розв’язання, аналіз результатів, а також ідеї підвищення каротиногенезу та пошуки методів стабілізації каротину при культивуванні біомаси мікрогрибу *Blakeslea trispora*, використання каротину у різних сполуках, розробка складу і технологій одержання продуктів на основі стабілізованого каротину в різних галузях промисловості, ідея модифікації методики аналізу жиророзчинних вітамінів та каротину, вивчення фізико-хімічних показників каротину при стабілізації, доклінічне вивчення каротинвмістних засобів, їх дія на біохімічні показники при лікуванні різних захворювань; вивчення впливу антиоксидантів на стабільність ліпідорозчинних сполук. Культивування біомаси з визначенням результатів проводились на КПК м. Верхне-Дніпровська Кунщіковою І.С., Кунщіковою Є.О.(3,21,22,23,25,29,37);

клінічне випробування препаратів - під керівництвом Пащука А.Ю (5,43,44), апаратурне забезпечення методу ВЕРХ –Староверовим В.М. (7,41,45,51); приготування зразків препарату та визначення фізико-хімічних показників – Черненкою Л.А., Зябченковою А.К., Кричківською Я.В., Дементій Р. М. (8,9,20,31,38,39,42,50,53), консультативна допомога - Донченко Г.В., Жуков В.І.(2,3,5,22,31,36) Матеріали дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі медичних вузів (Харківського, Львівського, Запорізького).

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи доповідались і обговорені на: 1У Всесоюзному симпозиумі з молекулярної рідинної хроматографії (м.Алма-Ата,1987р.), Всесоюзній конференції “Разработка и совершенствование технологических процессов, машин и оборудования для производства, хранения и транспорта продуктов питания” (м.Москва,1987р.), конференції “Исследование облепихи и облепихового масла” (м.Новосибірськ,1987р.), конференції “Биоантиоксиданты” (м. Москва,1989р.), конференції “Реконструкция, стабилизация и репарация мембран (м. Москва, 1989), Міжнародній конференції “Регуляция радикальных реакций” (м.Варна,1989р.), Всесоюзній конференції “Состояние и перспективы создания новых готовых лекарственных средств” (м.Харків,1990р.), Міжнародних науково-технічних конференціях “Информационные технологии: наука, техника, технология, образование и здоровье” (м.Харків, 1996-2001 р.р.), Міжнародній конференції “Нові технології отримання та використання БАР” (м. Алушта, 2002р.), конференції по біотехнології (м.Харків, 2003р.)

За розробку препарату “Аєкол” автора відзначено срібною медаллю ВДНГ СРСР та дипломом ВДНГ УРСР.

Публікації: за темою дисертації опубліковано 57 праць: три монографії, одну брошуру, 38 статей (35 в фахових виданнях, 17- одноосібні), тези доповідей на міжнародних конференціях, отримано 5 авторських свідоцтв, 3 патенти України, 1 Росії..

Структура і обсяг роботи. Дисертаційна робота складається із розділів: “Вступ”, “Огляд літератури”, “Матеріали та методи досліджень”, “Результати досліджень та їх обговорення”, “Висновки”, і “Додатки”, 320 сторінок, 64 рисунка, 88 таблиць. Список літератури з 340 найменувань.

Основний зміст роботи

У вступі обґрунтовано актуальність проблеми та подано характеристику роботи.

В аналітичному розділі приведено аналіз стану проблеми, засоби промислового одержання каротину, порівняльна характеристика фізико-хімічних показників рослинних олій як можливих основ для створення каротинвмістивних продуктів, аналіз фізико-хімічних показників каротинвмістивних олій, теоретичний аналіз біологічної дії каротинвмістивних олій.

У другому розділі наведено характеристику об’єктів дослідження: каротин мікробіологічний з біомаси мукорового гриба *Blakeslea trispora*, рослинні олії (соняшникова, кукурудзяна, соєва), жиророзчинні вітаміни А, Е, К₃, фенольні антиоксиданти (АО) –2,6-дитрет.бутил-4-метилфенол-(бутилокситолуол-БОТ),

3-трет.бутил-4-метилфенол (бутилоксианізол-БОО), та нові АО: 4-гідрокси-3,5-дитрет.бутил-феніл-бртоновая кислота (фенозан-кислота) та її похідні; 1,4-та 1,5- дитрет.бутил-пірокатехін (пірозан-1, пірозан-2)б щодо їх стабілізуючої дії у відношенні каротину мікробіологічного, рослинних олій, жирів та жиророзчинних вітамінів. Досліджувались також фізико-хімічні властивості розроблених сполук, їх специфічна активність при тривалих термінах зберігання, вплив технологічних факторів виготовлення на ці параметри.

Методи дослідження: В роботі використано продуцент β -каротину - мікрогриб *Blakeslea trispora* (штам 940/+, 64/-), культивування проводилось поверхневим та глибинним засобами. В процесі роботи проводились аналізи накопичення біомаси, ліпидоутворення, каротиногенезу та окислення каротину під впливом різних факторів. Біохімічні аналізи при ферментації біомаси виконували за описаними методиками (Бехтерева Я. М., 1980; Гаврилов А.С., 1984.; Колот Ф.Б., 1978; Куньщікова И.С., 1993), метилові ефіри жирних кислот одержували за методом [Carreau і Dubaso, 1978]. Мікробіологічний контроль розвитку біомаси в процесі ферментації проводили через 24,48,72 та 96 годин. Фракційний вміст ліпідів визначали з використанням газорідинної хроматографії (ГРХ), вміст каротину та вітамінів А, Е, Кз –високоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [Староверов В.М. и др., 1990], спектрофотометрії та традиційних методів. Ступінь окислення каротину вимірювали спектрофотометрично, визначали по пероксидатії (ПЧ), рівню кислотних чисел (КЧ), вмісту каротину в ліпідних сполуках при тривалому збереженні. Біологічну ефективність стабілізованого каротину вивчали на білих щурах при різних модельних патологіях (рани, травми, опромінювання та стреси іншого походження) з визначенням інтенсивності процесів пероксидного окислення ліпідів в різних органах та тканинах по накопиченню ТБК активних продуктів (МДА), дієнових кон'югатів (ДК). Визначення ДК проводили спектрофотометрично після екстракції сумішшю гептан:ізопропанол по модифікованому методу [Косухин А.Б. и др., 1987]; маленового діальдегіду (МДА) [Ohkawa I., 1979], визначення антиокислювальної активності (АОА) ліпідних екстрактів проводили по манометричному визначенню витрат O_2 в системі окислення кумолу в присутності ініціатора-азобісізобутилонитрила [Кудрин А., 1986]; жирні кислоти визначали методом ГЖХ на хроматографі "Shimadzu GC-14B"; рівень ферментативного антирадикального захисту визначали по активності СОД [Nishikimi M., 1972]; ефективність ранозагоюючої дії препаратів - по інтенсивності синтезу білка (включенню радіоактивної мітки в загальний мітохондріальний білок) при виразковій хворобі, загальний білок визначали по Lowry et al., [1951], рівень холестерину та фосфоліпідів по Osborn N., [1974]. В роботі використано комплекс фізико-хімічних методів (КЧ, ПЧ) аналізу об'єктів дослідження, що дозволило оцінити їх якісні і кількісні зміни при тривалому збереженні та в процесі промислового виготовлення. Використано як традиційні методики, так і сучасні інструментальні методи, у тому числі окислення каротинвмістних сполук в реакції ініційованого окислення кумолу (РІОК), автоокислення, реакції окислення цих сполук в тоці кисню при різних температурних режимах та умовах зберігання. Доклінічні іспити біологічної дії проводили на лабораторних білих

щурах, мишах, кролях. При вивченні антиоксидантної дії препаратів використовували щурів, котрих піддавали гострому або хронічному стресам методом імобілізації та дії електроструму [Гуляєва Н.А., 1988].

У третьому розділі розглянуто вплив зовнішніх факторів на каротиногенез та окислення каротину. Вивчалась дія різних факторів: мікроелементів ($\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), вітамінів (К₃, В₆, В₁ та їх сумішів), антиоксидантів (α -токоферолу, 2,6-дитрет.бутіл-4-метилфенолу), прооксидантів (H_2O_2 та KMnO_4) на процес окислення каротину при культивуванні мікрогриб

Таблиця 1.

Каротиногенез, ліпидоутворення, фізико-хімічні показники в біомасі *Blakeslea trispora* при дії мікроелементів та вітамінів

Умови культивування гриба	Вихід біомаси, г/л	Ліпіди, % від сухої біомаси	ПЧ %J ₂	КЧ, мг КОН	Вміст каротиноїдів, мг %
Контроль	5,0±0,1	20,8±1,0	0,06±0,02	3,6±0,3	380,4±19,3
Вітаміни (К ₃ , В ₁ , В ₆)	7,1±0,1	16,0±1,1*	0,07±0,04	3,7±0,3	492,4±17,7*
Суміш мікроелементів	7,5±0,1	16,6±1,1	0,09±0,03	3,6±0,2	551,2±28,5*
Na_2MnO_4 +вітамін К ₃ ,	6,5±0,4	14,2±1,3	0,14±0,03*	4,1±0,4	594,5±31,4*
Мікроелементи+ вітаміни	8,8±0,5*	22,6±1,2*	0,13±0,02*	3,6±0,4	659,8±48,5*

* $p < 0,05$ по відношенню до контролю

Вихід каротину в біомасі збільшувався на фоні коливання рівня ліпідів (табл.1). Значне зниження ліпидоутворення відмічено при внесенні до середовища Na_2MnO_4 та вітаміну К₃. Зниження кількості ліпідів не впливало на динаміку окислення каротину з біомаси, рівень пероксидів при окисленні каротину з біомаси, котра вирощувалась в присутності антиоксидантів, був однаково високим в умовах контролю та досліду (табл.1).

Ураховуючи дані літератури [Ratray Y.1984] про те, що зміна окислювальних умов у середовищі культивування може позначитися на фізико-хімічній системі регуляції клітинного метаболізму мікроорганізмів, в середовище культивування *Blakeslea trispora* вносили антиоксиданти 2,6-дитрет-бутіл-4-метилфенол (0,02%) та прооксиданти – H_2O_2 (0,01%); KMnO_4 (0,01%). Відомо [], що внесення в середовище культивування антиоксидантів- ізонікотиніла гідразина або сантохіну супроводжується стимуляцією каротиногенезу, однак ці речовини можуть накопичуватися в біомасі і в процесі екстрагування переходити в кінцевий продукт, збільшуючи рівень його токсичності. Перекис водню, KMnO_4 та БОТ – були вибрані нами завдяки їх відносній дешевизни та нетоксичності. Трьохразове внесення до середовища культивування KMnO_4 приводило до збільшення каротиногенезу на фоні незначного підвищення ліпидоутворення, рівня біомаси та високих показників ПЧ (табл.2). Окислювальність каротиноїдів, одержаних в умовах культивування з прооксидантами та антиоксидантом БОТ, не зменшувалась (табл.2). Але рівень перок-

сидів при окисненні каротину з біомаси, що вирощувалась в присутності АО, був високим в умовах досліду та контролю.

При біотехнологічному отриманні мукорового грибу *Blakeslea trispora* двохфазність накопичення біомаси та каротиноїдів супроводжується відповідними змінами накопичення ліпідів.

Таблиця 2

Синтез каротиноїдів, ліпідів та біомаси *Blakeslea trispora* під впливом прооксидантів та антиоксиданта БОТ

Показники	Конт роль	KMnO ₄		H ₂ O ₂	БОТ	ПЧ, %J ₂
		3x0,01%	1x0,01%			
Біомаса, г/л	5,0±0,3	6,2±0,4	7,8±0,08	7,4±0,8	7,5±0,6	0,08±0,00
Каротин, мг%	328±30	348±46*	457±51	420±32*	485±47*	0,07±0,00
Ліпіди, % від біомаси	14,0±1,1	19,1±1,5*	14,0±1,3	19,1±2,1	18,6±2,9	0,08±0,00

*p<0,05 по відношенню до контролю

При порівнянні з початковою фазою росту (18-20 годин) у стаціонарній фазі спостерігалось значне збільшення ліпидоутворення. Розподіл жирних кислот супроводжується значною перевагою ненасичених жирних кислот (олеїнової, лінолевої та ліноленової). Ліпіди вивчених штамів відрізняються переважним вмістом ненасичених жирних кислот з 18 атомами вуглецю у молекулі з перевагою лінолевої кислоти, вміст якої коливався у повній фазі дозрівання у межах 38-52% в залежності від статевої належності гриба. Введення в середовище ферментації бутилокситолуолу у концентрації 0,02% при різному співвідношенні азоту та вуглецю приводило до зміни рівня ненасичених жирних кислот, особливо значне коливання C_{18:2} при співвідношенні C/N 40:8 та C_{18:1}, C_{18:2} при співвідношенні C/N 35:6. (табл.3).

Зміна вмісту окремих жирних кислот в процесі розвитку *Blakeslea trispora* на середовищі з різним вмістом азотного живлення мала практично однозначний характер. Чим більше різниця співвідношення C/N, тим більше синтезується ненасиченої лінолевої кислоти на фоні зниження насичених жирних кислот, а також олеїнової кислоти, що може свідчити про протікання у період їх накопичення активних процесів десатурації жирних кислот

Таблиця 3.

Вихід ліпідів в біомасі при різному співвідношенні C/N в присутності антиоксиданту БОТ

Ненасичені жирні кислоти	Співвідношення C/N, %		
	40:9	40:8	35:6
C _{18:1}	без зміни	95,3±10,3	85,0±9,4
C _{18:2}	104,8±9,9	117,7±10,7	121,0±11,7*
C _{18:3}	103,8±11,5	99,5±15,8	99,5±10,1

* p<0,05 по відношенню до контролю

Таким чином, регулюючи середовище культивування *Blakeslea trispora* внесенням різних компонентів можливо впливати на процес каротиногенезу, ліпидоутворення, нарощування біомаси, але зниження окислювальності каротиноїдів при дії на середовище культивування досягнути при вивчених умовах не вдається. Рівень каротиноїдів при тривалому збереженні масляного розчину падає, фізико-хімічні показники через 2 роки збереження не відповідають вимогам ТУ на каротин (табл.4)

Таблиця 4.

Показники “Каротину мікробіологічного” через 2 роки збереження

Вміст біологічно-активних компонентів	Вихідні	Через 2 роки	Фізико-хімічні показники каротину	Вихідні	Через 2 роки
Токоферолі: заг.мг%	67,5±8	37,3±3,8*	КЧ, мг КОН	1,3±0,1	3,6±0,2*
α-токоферол, %	91,6±10	55,1±5,2*	ПЧ, % I ₂	0,01±0,0	1,4±0,1*
Ліноленова	19,5±2	13,3±1,8	Неомилені речовини, %	1,5±0,2	1,5±0,1
Олеїнова	18,7±2	16,7±1,9			
Лінолева	57,1±6	53,6±6,3			
β-каротин % до заг.	91,2±8	16,5±1,7*	Каротиноїди, заг., мг %.	225±19	40±4,7*

* p<0,05 по відношенню до контролю

Не дивлячись на високу ступінь окислювальності висока біологічна дія, обумовлена складом каротину, робить актуальним питання розробки на його основі високоефективних лікарських засобів та продуктів з високою біологічною дією. Однак, каротин є чутливим до кисню, температури, світла (згідно ТУ 64-6-149-80 термін збереження дорівнює 6 місяцям), що досі не давало можливості його використання при розробці лікарських засобів, які повинні мати термін зберігання 2 та більше років. Створення високоефективних біологічно-активних каротинвмісних засобів можливе тільки при вирішенні проблеми захисту каротину та його носіїв від окислення. Проблема ускладнюється тим, що як носій каротину мікробіологічного застосовують рослинні олії, які теж значно окислюються з утворенням вільних радикалів, чим обумовлені короткі терміни зберігання олій (4-10міс. в залежності від упаковки). При незначній глибині окислення змінюються, головним чином, органолептичні властивості олії, що знижує харчову цінність продукту в процесі зберігання та обмежує можливість використання олій як основи при розробці лікувальних засобів з каротином.

При аналізі фактичного матеріалу з ефективності природних антиоксидантів, що використовують як антиоксиданти (АО) (токоферолів, вітамінів групи К, тощо) звертає на себе увагу те, що одні і ті ж самі АО можуть бути ефективними в одних системах і незначно гальмувати окислювальні процеси в інших, а також по-різному поводитись при сумісній присутності в олійних розчинах. Так, багатьма дослідженнями доведена слабка антиокиснювальна дія α-токоферолу при його високій біологічній дії. Але критичний огляд робіт показує, що вклад реакції подовження ланцюгу при застосуванні токоферолів як антиоксидантів

виявляється різним в кожному конкретному випадку. Вірніше говорити про токофероли як антиоксиданти з високою потенційною активністю, яка буде себе проявляти чи не проявляти в залежності від властивостей середовища, в якому вони застосовуються. Проблема ефективного застосування α -токоферолу вирішувалась нами при застосуванні його разом з 2-метил-1,4-нафтохіноном (вітаміном K_3) для захисту ліпідної системи від окислення при сумісній присутності їх з просторово-утрудненим фенольним АО - БОТ, 3-трет.бутил-4-метилфенолом (БОА), та новими АО, наслідком чого виявлялось збільшення терміну збереження каротинвмісних ліпідних сполук (табл.5). Треба зазначити, що при внесенні до складу каротину на олії жиророзчинних вітамінів з БОТ, дозволеного для застосування в харчовій та медичній промисловості, фізико-хімічні показники олії на 24-ому місяці свідчили про збереження якості (табл.5)

Таблиця 5

Фізико-хімічні показники каротину на олії в присутності АО (автоокислення, $T=293K$)

Зразки, (n = 11)	Переокисні числа (% I_2)		Кислотні числа (мг КОН)	
	Похідн.	24 міс.	Похідн.	24 міс.
Соняшникова олія	0,018±0,	0,850±0,07	0,22±0,02	4,59±0,03
+β-каротин	0,021±	0,990±0,08	0,25±0,02	5,45±0,04
++вітамін Е	0,018±	0,230±0,03*	0,23±0,02	3,26±0,2
+++ віт. K_3	0,019	0,070±0,006*	0,25±0,02	2,62±0,2*
++++БОТ	0.019±	0,019±0,002*	0,24±0,02	1,37±0,1*

* $p < 0,05$ по відношенню до контролю без домішок

Для стабілізації ліпідних сполук додають суміші антиоксидантів, для котрих може відмічатися явище синергізму. Однак, механізм синергетичного ефекту не завжди зрозумілий. Виходячи з особливостей дії токоферолів імовірно, що ефективність вивчаемого просторово-утрудненого фенольного АО-2,6-дитрет.бутил-4-метилфенола (БОТ) у системах, які мають токофероли, обумовлена взаємодією з ними.

Різниця в константах швидкості інгібування БОТ та токоферолів (приміром на 2 порядку) дозволяє застосувати для вивчення механізму дії їх сумішей реакцію ініційованого окислення кумолу (РІОК), яку проводили при швидкості ініціювання $W_i = 6,0 \cdot 10^{-8}$ моль/л ($T=333-343 K$), в якості ініціатора використовували азоізобутилонитрил (АІБН). Кількість поглиненого кисню вимірювали на газометричній установці. При введенні в реакцію суміші α -токоферолу з БОТ в умовах, коли $(InH)_{сум.} = 1,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $W_i = 6,0 \cdot 10^{-8}$ моль/л · с, α -токоферол і БОТ не взаємодіють - час витрачання кожного АО відповідав його концентрації. При підвищенні швидкості ініціювання відмічалось незначне підвищення співвідношення концентрацій за рахунок α -токоферолу. При багаторазовому збільшенні концентрації α -токоферолу та швидкості ініціювання відмічалась помітна зміна

співвідношення АО, що свідчить про регенерацію α -токоферолу в цих умовах та про взаємодію між інгібіторами, що подовжує дію АО в складній ліпідній системі.

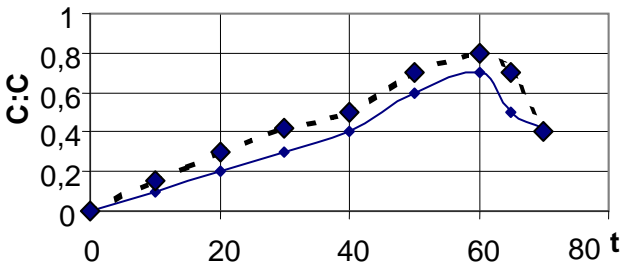


Рис. 1. Залежність індукційного періоду (t) інгібування окиснення соняшникової олії при Т-333К від співвідношення антиоксидантів

Деструктивне руйнування каротину при ініційованому окисненні з АО гальмувалось більш ефективно при застосуванні виявленої групи α -токоферол +БОТ (рис. 1). При заміні БОТ на БОА в тих же співвідношеннях БОА менш ефективний (рис. 2.)

Деструктивне руйнування каротину та вітаміну А на основі рафінованої дезодорованої олії значно гальмується до повної стабілізації процесу при збереженні зразків на протязі 2 років при введенні в полівітамінну ліпідну систему з каротином фенольного екранованого антиоксиданту БОТ більш ефективно, ніж при введенні БОА, що підтверджується і результатами вискоэффективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

В загальній схемі процесу інгібованого окислення в реакції:

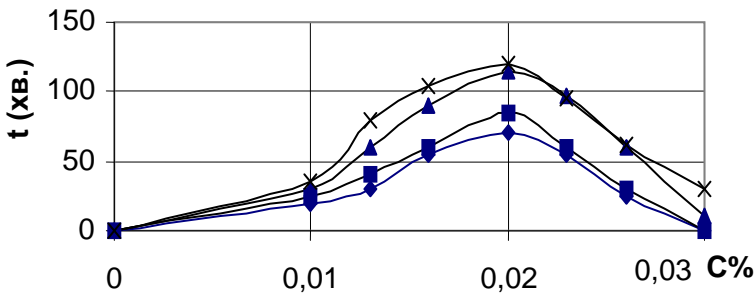
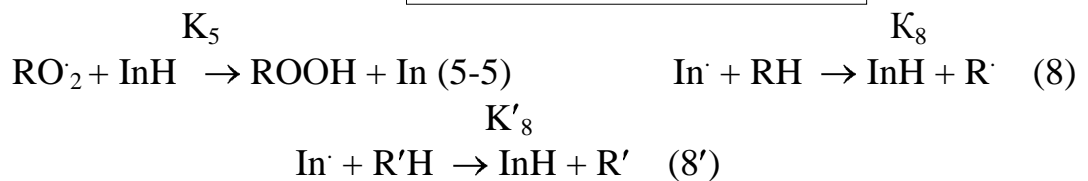
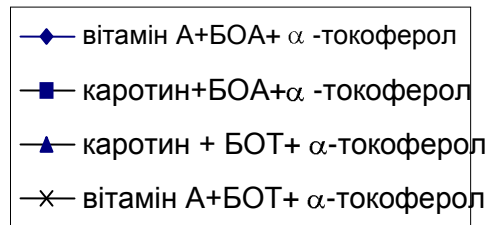
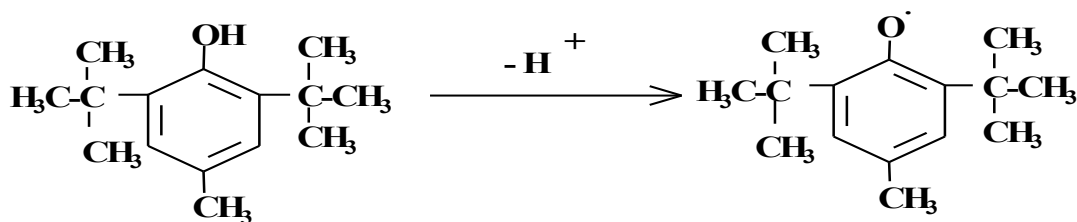


Рис.2.Залежність індукційного періоду (t) інгібованого окиснення від сумарної концентрації суміші АО

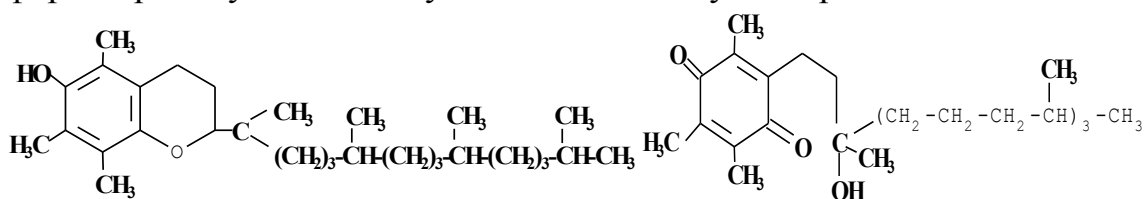


із збільшенням концентрації АО все більш значну роль повинні відігравати реакції передачі ланцюга (-5), в яку не вступає 2,6-дитрет.бутил-4-метилфеноксильні радикали, звідкіля можна очікувати, що при застосуванні 2-трет.бутил-4-метилфенолу (БОА), індукційний період буде зростати повільніше, ніж при внесенні в ліпідну систему БОТ. Отримані результати дозволяють зробити припущення, що введення в каротинвмістивну систему разом з α -токоферолом БОТ приводить по реакції (5) до утворення 2-трет.бутил-4-метоксифеноксильних радикалів, які взмозі приймати участь в передачі ланцюгу (-5), (8) та (8'), внаслідок чого реакція 5 може не приводити до обриву кінетичного ланцюга окиснення і середнє число молекул інгібітора, яке

припадає на 1 реакцію обриву ланцюгу буде зростати, тому механізм синергетичної дії БОТ з α -токоферолом в захисті каротину на основі рослинної олії може полягати як в реакціях регенерації токоферолу, так і в утворенні фенокислих радикалів. Токоферол при окисненні переходить у форму хінону.



Дія БОТ пов'язана з відщепленням протону від гідроксильної групи з утворенням стабільного радикалу. Як тільки токоферол переходить в окислену хіноїдну форму, його відновлення відбувається під дією H^+ , утворення гідроперекисних форм каротину може блокуватись довгоживучими радикалами БОТ.



. Таким чином, стабілізація каротинвмісної полівітамінної суміші просторово-утрудненим фенольним АО- БОТ у синергізмі з α -токоферолом більш ефективна, ніж при застосуванні БОА. Вивчення жирно-кислотного складу складу каротину з вітамінами та антиоксидантами через 2 роки збереження не виявив значного відхилення від контролю, зміст ненасичених жирних кислот практично не змінювався.

У п'ятому розділі розглянуто окиснення каротину в твердих жирних основах. Об'єктом вивчення був: каротин мікробіологічний на основі: гідрованої соняшникової олії (ГСО), масла какао, жирової основи для супозиторіїв (сплав жирів: масла какао, харчового парафіну та кулінарного "Фрітюрного" жиру -СЖ), а також жирової основи Горьківського ХФЗ (ГХФЗ) з компонентами, експериментально обгрунтованими в процесі розробки рецептури та технології виготовлення супозиторіїв з каротином. В процесі автоокиснення жирних основ з каротином будували кінетичні криві накопичення перекисей, графічно відображали період індукції $\tau_{0,1}$ (по часу досягнення ПЧ 0,1 в $\%I_2$) для кожної основи. Жирові основи при підвищенні температури (Т-313К та більше) змінюють агрегатний стан (розплавлюються), що може супроводжуватись зміною швидкості та характеру окиснення основи та введенням до її складу компонентів. Для перенесення даних, отриманих при підвищених температурах, в природні умови збереження каротину, потрібно довести, що характер окиснення не змінюється при переході основи з одного агрегатного стану в інший. Залежність швидкості реакції від температури виражається відомим рівнянням Ареніуса. З метою визначення чи виконується рівняння при переході основи в розплавлений стан проводили автоокиснення жирних основ з каротином при Т-323-343К. Як характеристику швидкості процесу використовували час $\tau_{0,1}$.

З гістограми видно, що жирові основи значно відрізняються між собою за

значенням періоду індукції, для кожної основи з каротином він індивідуальний та відрізняється один від одного в 2-7 разів. При підвищенні температури період індукції жирової основи значно скорочується (4.2.). Залежність періоду індукції від t згідно з рівнянням Арреніуса виражаємо: $\tau = \tau_0 \cdot e^{-E/RT}$; логарифмуючи вираз, отримуємо $\ln \tau = \ln \tau_0 + E/2 \cdot 3R \cdot 1/T$. Залежність періоду індукції від значення зворотньої температури $1/T$ в досліді добре спрямовується в координатах Арреніуса ($\ln \tau_0 \leftrightarrow 1/T \cdot 10^3$). Отже, розплав жирової основи з каротином не призводить до зміни механізму процесу окислення, що дає можливість переносити результати, отримані при підвищених температурах, в умови зберігання каротинвмісних препаратів.

- 1 – СЖ
2 – ГХФЗ
3 – ГСО

Рис.3. Характеристика швидкості процесу окислення каротину в жирах.

З метою обґрунтування вибору антиоксидантів проводили вимірювання серії кінетичних кривих при ініційованому окисненні основ ГСО, ГХФЗ та СЖ з каротином при внесенні антиоксидантів в різних концентраціях (табл. 6).

Таблиця 6.

Значення основних показників АО при ініційованому окисненні каротину в жирах (333⁰ К)

Основа, Wi, моль/л·с	АО 4·10 ⁻⁴ моль/л	τ , хвилин	f, відносні одиниці	$K_7/\sqrt{k_6}$, л/моль·с	ϵ_R , відносні одиниці
Гідрована. олія	БОТ	8,3	3,2	5,0	1,6
2.66·10 ⁶	БОА	5,4	2,1	42,8	7,5
Суміш жирів	БОА	17,5	2,7	60,5	8,5
1.0·10 ⁻⁶	БОТ	19,8	2,8	11,3	1,8
	α -токоф.	19,5	1,5	201,0	13,5
Жирова основа ГХФЗ	БОА	22,4	2,4	77,0	8,7
0,7·10 ⁻⁶	БОТ	21,1	2,2	16,2	1,9

	α -токоф.	17,2	1,9	134,1	11,2
Жирова основа ГХФЗ	БОТ+ α -токоф.	29,3	1,6	195	13,1
$0,7 \cdot 10^{-6}$	БОА+ α -токоф.	18,7	1,7	184	11,9

* $p < 0,05$ по відношенню до контролю

Залежність τ від концентрації інгібітора та швидкості ініціювання виражаємо рівнянням: $\tau = f \cdot [\ln \cdot H] / W_i$, по якому можливо визначити значення f , період індукції прямопропорційний концентрації інгібітора, β_{\max} визначали при використанні отриманих даних константи швидкості інгібування ($k_7/\sqrt{k_6}$) та стехіометричного коефіцієнту інгібування (f). В табл.6 приведені дані відносної антирадикальної активності ε_R вивчаємих АО.

Отримані кінетичні параметри – стехіометричний коефіцієнт інгібування (f) та константа $k_7/\sqrt{k_6}$ дають більш повну наявність про ефективність АО та дозволяють виявити антирадикальну активність інгібіторів при створенні фармпрепаратів на основі твердих жирів. За значенням ε_R вивчених АО бачимо, що більш високу антирадикальну активність (АРА) показали: у СЖ та ГХФЗ - α -токоферол; ГСО - БОА, при сумісній присутності α -токоферолу та фенольних АО більша АРА виявлена у парі АО: α -токоферол + БОТ в основі ГХФЗ.

Пошуки нової сировини для збагачення харчових властивостей продуктів бісквітної промисловості привели нас до використання каротину в твердих жирах разом з антиоксидантом тваринного походження - карнозином у сполученні з α -токоферолом в жировій начинці для бісквітних виробів. Антиокиснювальна активність карнозину в синергізмі з α -токоферолом щодо каротину в жирах “Прима”, “Фрітюрний”, “Кулінарний”, “Кондитерський” вивчали на моделі РІОК (соокислення ліпідів кумолом при підвищених температурах з реєстрацією поглиненого кисню) та методом визначення ТБК-активних продуктів перекисного окислення ліпідів, де субстратом окислення використовуються тканини мозку щурів.

Продукцію з внесеними біологічно-активними речовинами зберігали два місяці при підвищеній температурі (310К). Експериментально було доведено, що введення до складу жирової начинки вафлів групи антиоксидантів (карнозин+ α -токоферол) у співвідношенні 1:2 гальмувало окислення каротину та жиру (рис. 4.).

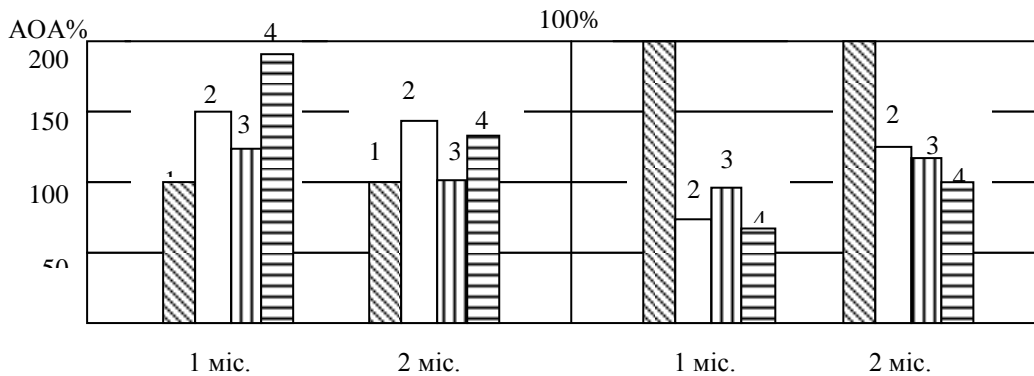


Рис. 4. Антиоксидантна активність Утворення ТБК-
 БАР в жирі "Прима" (РІОК) для печива; активних продуктів (Жир "Прима")
 1 – контроль; 2 – 0,05% α -токоферола, 3 – 0,1% карнозину; 4 – 0,05%
 α -токоферолу+0,1% карнозину

Антиоксидантний захист каротину спостерігали по кількості каротиноїдів в процесі зберігання (рис.5.). Вимірювання швидкості поглинання кисню дозволило визначити активність карнозину у синергізмі з α -токоферолом як сумарного антиоксиданта (табл.6).

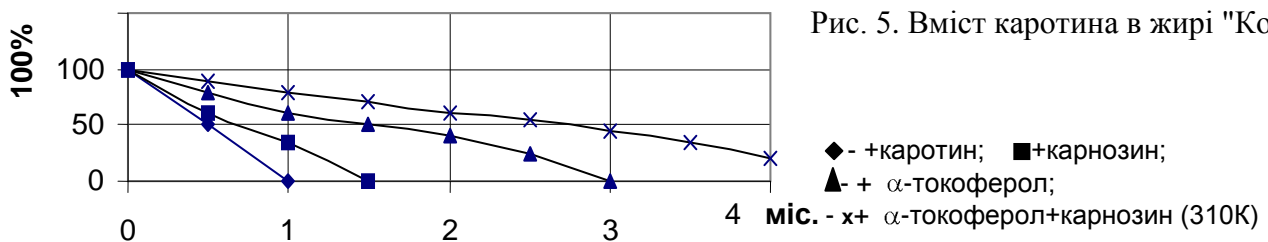


Рис. 5. Вміст каротина в жирі "Кондитерський"

Таблиця 7

Швидкість поглинання кисню в зразках жирів з каротином при тривалому збереженні

Умови досліджу	Швидкість поглинання O_2 , моль/л·с			
	Жир кулінарний		Жир фритюрний	
	1 місяць	4 місяця	1 місяць	4 місяця
Контроль	$0,45 \cdot 10^{-6}$	$4,52 \cdot 10^{-5}$	$0,50 \cdot 10^{-6}$	$3,23 \cdot 10^{-5}$
АО	$0,23 \cdot 10^{-6}$	$0,25 \cdot 10^{-5}$ *	$0,25 \cdot 10^{-6}$	$0,50 \cdot 10^{-5}$ *

* $p < 0,05$ по відношенню до контролю

Використання прискореного методу поглинання кисню дозволило зробити висновок про активність карнозину в синергізмі з α -токоферолом при захисті каротину від окиснення в кулінарних жирах. Отримані результати дають можливість розробляти рецептуру виробів з підвищеною біологічною цінністю та лікувально-профілактичною протистресорною дією з термінами зберігання, відповідаючими сучасним умовам збереження.

У шостому розділі наведено приклади використання стабілізованого каротину мікробіологічного походження при розробці нових лікарських засобів. Каротин в обліпиховій олії за даними літератури відіграє провідну роль при застосуванні її як ранозагоючого препарату. Каротинвмісні рослинні олії, маючи високий ступінь лікувальної дії, в той же час мають короткий термін

зберігання. При вирішенні питання розробки каротинвмістивної олії, аналогічної за дією обліпиховій, треба було вирішити проблему захисту жиророзчинних вітамінів на основі рослинної олії, теоретично та експериментально обґрунтовано вибраної як основи розробляемого лікарського засобу. Аналіз “Каротину мікробіологічного”, виробляемого на Свердловському та Верхньо-Дніпровському комбінатах, виявив наявність 91-94% β -каротину від суми каротиноїдів, що значно перевищує наявність β -каротину в олії обліпихи (50 мг%), а також значну кількість біологічно-активних речовин, в тому числі ненасичених жирних кислот. Виходячи з вимог фармкомітету, де лікарський засіб повинен за фізико-хімічними показниками та специфічною активністю зберігати свої якості до 2 років, треба було вирішити 3 основних завдання: вибрати олійну основу для каротину, складові частини нових препаратів та вирішити питання про захист жиророзчинних речовин від окислення при вирішенні технологічних завдань.

Аналіз зразків обліпихової олії та фармакопейного препарату “Обліпихова олія” виявив, що вони відносяться до групи олеїново-лінолевих олій та відрізняються за складом жирних кислот (%), виявлених методом газорідинної хроматографії ($C_{18:1}$ - 12,1-14,2; $C_{18:2}$ 18,8-21,2; $C_{18:3}$ -6,6-25,4); та каротиноїдам (185-223 мг%). При порівнянні швидкості окислення обліпихової, соняшникової олій індукційний період був вищим у обліпихи (обліпихи - 19,8; соняшникової олії - 8,1). До складу обліпихової олії входить група природних антиоксидантів, що захищає її від швидкого окислення, однак термін її зберігання - 1 рік. Вибір соняшникової олії як основи для каротинвмістного засобу було продиктовано як достатньою кількістю в ній важливих для організму олеїново-лінолевих кислот, так і її доступністю та дешевизною.

До складу препарату крім каротину мікробіологічного в рослинній олії ввели жиророзчинні вітаміни: α -токоферолацетат (E), 2-метил-1,4-нафтохинон (K_3), ретинол ацетат (A) в кількості, що сприяла підвищенню його лікарської дії та захисту каротину від окислення. Олійний каротинвмістний полівітамінний розчин з АО назвали “Аскол. Окислення каротинвмістних олій супроводжується ослабленням забарвлення, що пов’язано, в першу чергу, з окислювальною дією каротиноїдів, тому окиснення зразків з каротином та АО проводили в тоці кисню при Т-333К до повного руйнування каротину. Почергове введення в каротин на рослинній олії кожного з біологічно активних компонентів відображалось на тривалості його окиснення (рис. 6).

Більш прискорене окислення каротину у присутності ретинолацетату можна пояснити значною нестабільністю останнього при порівнянні періоду полурозпаду вітаміну А у різних рослинних оліях (кукурудзяна, соняшникова, соєва), коли було виявлено, що найбільш високим цей показник був в зразках

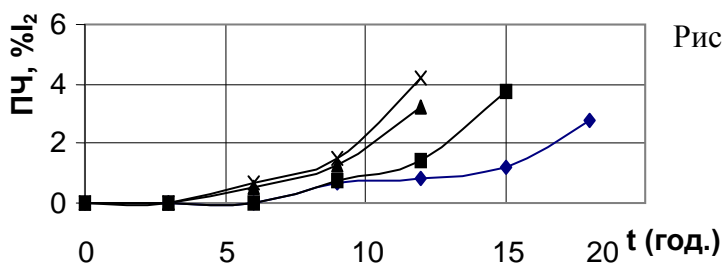
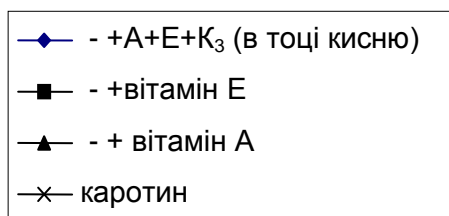


Рис. 6. Залежність окислення каротину від АО



на основі кукурудзяної олії (відповідно 19,2 : 3,7:11,0).

Для стабілізації каротину та вітаміну А в масляному розчині було впробувано фенольні антиоксиданти: 2,6-дитрет.бутил-4-метилфенол (БОТ) та 2-трет.бутил-4-метилфенол (БОА), які дозволені для використання в харчовій та медичній практиці. Їх вносили до складу масляновітамінного комплексу (“Аєкол”) в концентрації 0,02%. Зразки штучного аналогу, виготовлені на різних оліях, окислювали в умовах прискореного старіння до повної деструкції каротиноїдів (табл. 7).

Таблиця 8

Динаміка окислення “Аєколу” з фенольними антиоксидантами (Т=333К) на різних оліях

Основа “Аєкола” (олія)	Час повного окиснення (t) каротину (доба) при Т=333К					
	БОТ		ε	БОА		ε
	Контроль	Дослід		Контроль	Дослід	
Соняшникова	56±5,0	134±10,1 *	2,39	57±5,2	112±10, 5*	1,96
Соева	40±3,3	78±7,9*	1,95	42±3,6	68±5,7	1,62
Кукурудзяна	45±4,0	63±4,3	1,40	44±4,8	59±6,1	1,34

* $p < 0,05$ по відношенню до контролю

Не дивлячись на кращі показники стабільності ретинолацетату у кукурудзяній олії, (по даним літературни), стабільність жиророзчинних вітамінів А, Е, К₃, провітаміну А- каротину у присутності бутилокситолуолу (високоєфективна рідинна хроматографія) на основі соняшникової олії була вище (табл.9).

Таблиця 9

Вплив БОТ на фізико-хімічні показники “Аєколу” при тривалому збереженні

Досліджувані Показники	Аєкол без БОТ		Аєкол з БОТ	
	Вихідні Дані	Через 26 міс. зберігання	Вихідні Дані	Через 26 міс. Зберігання
КЧ, мгКОН	0,89	1,85	0,91	1,23
Каротиноїди, мг%	227,0	178,9*	220	205
Вітамін Є, г/мл	0,0019	0,0016	0,0020	0,0016
Вітамін К ₃ , г/мл	0,0006	0,0004	0,0006	0,0005
Вітамін А, МЕ/мл	3533	2220*	3500	2905*

Таким чином, одержана каротинвмістна олійно-вітамінна суміш при заданому співвідношенні жиророзчинних вітамінів та фенольного антиоксиданту, яка за фізико-хімічними та органолептичними показниками наближалася до природних каротинвмістних олій (обліпихової). Були напрацьовані зразки “Аєколу” на основі соняшникової олії та закладені на два роки зберігання при кімнатній температурі (20-22°C), після чого проведено аналіз основних показників згідно до розробленого нормативного документу на препарат (ВФС 42-1648-95).

В сьомому розділі проведено вивчення біологічної активності препаратів на основі стабілізованого каротину мікробіологічного після довготермінового збереження. Сучасний аналіз механізмів розвитку біохімічних зру-

шень при різних патологіях включає розгляд вільно-радикальних порушень як одного з факторів патогенезу, який приводить до змін в клітинному метаболізмі, який торкається всіх сторін обміну речовин. Серед широкого класу речовин, які володіють антиоксидантними властивостями, β -каротину та токоферолу відводиться важливе місце в захисті організму від ліпопероксидації. З цією їх якістю зв'язана велика кількість фізіологічних проявлень недостатності цих вітамінів, яке проявляється у вигляді патологій, молекулярний механізм котрих тісно зв'язаний з перекисним окисленням ліпідів. Регуляція ліпідного метаболізму – актуальна проблема для лікувальної, профілактичної та екологічної медицини. Виходячи з вищевказаного терапевтичну активність препаратів на основі стабілізованого каротину мікробіологічного походження вивчали на моделях *in vivo* та *in vitro* при виразці травного тракту, опромінюванні, ранах та травмах.

Досліди терапевтичного впливу стабілізованого каротину мікробіологічного (Асколу) після 2 років збереження проведені на білих щурах масою 180-220гр. Больовий стрес викликали електрострумовим ураженням (сила струму 3-4 мА) протягом 12 діб по 2 години. У сироватці крові виявляли первинні та вторинні продукти вільно-радикального окислення та рівень неферментативної супероксидперехоплюючої активності (СПА). З гомогенату мозку виділяли фосфоліпіди, холестерин та вивчали антиокислювальну активність (АОА) при соокисленні ліпідів з кумолом при Т-310К (метод імітує перекисне окислення в ліпідах мембран клітин) (табл. 10.)

Таблиця 10

Стан ПОЛ в органах при стресі під впливом Асколу

Вивчаємі Показники	Умови дослідів (контроль 100%)			
	Стрес	+ α токоферол	+Аскол-“Р”	+Аскол-“А”
Холестерін	130,1 \pm 9,1*	76,1 \pm 5,4	62,4 \pm 3,4	65,1 \pm 2,3
Фосфоліпіди	91,4 \pm 6,4	100,2 \pm 10,3	109,1 \pm 3,5	115,2 \pm 10,4
ДК (кров) (мозок)	145,3 \pm 10,8*	71,3 \pm 6,2*	41,6 \pm 3,1**	36,1 \pm 2,3*
	75,3 \pm 4,3*	51,4 \pm 4,3*	34,5 \pm 1,8**	30,2 \pm 2,8*
Фосфатидилхо	134,5 \pm 12,6*	82,1 \pm 7,14*	63,1 \pm 5,4**	65,3 \pm 6,8*
ТБК-продукти	196,3 \pm 18,1*	137,2 \pm 3,0	124,4 \pm 1,9**	125,1 \pm 1,7*

* $p < 0,05$ до контролю; ** $p < -0,05$ до стресу (“Р” рослинна олія; -“А” – олія амаранту)

Отримані результати свідчать про те, що профілактичне введення “Асколу” також, як α -токоферолу ослаблює активацію вільнорадикального окислення в тканинах мозку при стресі, приводячи до інгібування цього процесу та накопичення легкоокислювальних ліпідів. Більш ефективна антиоксидантна дія Асколу (незважаючи на різні олійні основи) у порівнянні з α -токоферолом може бути результатом не тільки перехоплювання вільних радикалів та активації оксидперехоплюючої активності, але й процесів, обумовлених складною будовою каротину та антиоксидантів, що його стабілізують.

Вплив Асколу, що мав термін зберігання 2 роки, на ранозагоюючі процеси вивчався на моделях: виразкової хвороби травного тракту та ранах різної етіології. Препарат вводили щурам на фоні розвинутого деструктивного процесу в стінках шлунку, отриманого електричним струмом. У щурів, що отримували

лікування Асколом, знижувалась кількість деструктивних уражень слизової оболонки (індекс виразковості та коефіцієнт противиразкової активності (табл.11). Розвиток виразкового ураження шлунку супроводжувався суттєвою зміною Швидкості синтезу клітинних білків (по включенню C^{14} в мітохондріальні білки) був інтенсивнішим при застосуванні Асколу (103%-без лікування, 198%-при лікуванні).

Таблиця 11

Ефективність заживлення електрострумової виразки шлунку під впливом "Асколу"

Умови досліджу	Доза, Мл/100 г	Кількість щурів загальна виживших		Відсоток щурів з виразками	Індекс виразковості /ІВ/	Противиразковий коеф
Контроль	-	23	13	100	2,90±0,26	-
"Аскол"	0,1	10	7	57	1,25±0,29*	1,9

* $p < 0,05$ до контролю

Виходячи з того, що механізм антиоксидантної дії β -каротину не той, що у фенольних АО, і може бути пов'язаний з утворенням малоактивних вуглець-центрованих резонансних радикалів в ізопреноїдному ланцюгу при взаємодії з активними радикалами органічних гідропероксидів, можна припустити, що при застосуванні каротинвмістивних препаратів може збільшуватися антиоксидантний потенціал тканин та імунореактивність організму. Щурів фіксували на дощі та визивали подразнення електрострумом (комбінований стрес). Визначали рівень ПОЛ по складу дієнових кон'югатів (ДК) та малонового діальдегіду (МДА) (табл.12). Стан імунної системи визначали по рівню клітинного та не клітинного імунітету (табл. 13)

Показники табл. 12 та 13 свідчать про ефективну корекцію Асколом рівня ПОЛ та імунного стану, що підтверджує високу біологічну дію препарату після довгострокового збереження (2 роки).

Таблиця 12

Вплив Асколу та каротину на показники ПОЛ у щурів (віком 5міс.) при дії стресу

Умови досліджу	Сироватка крові		Слизова оболонка кишки		Печінка	
	Дієнові кон'югати, ум..од.		Малоновий діальдегід, нмоль/г		Малоновий діальдегід, нмоль/г	
	1 доба	3 доби	1 доба	3 доби	1 доба	3 доби
Контроль	1,5±0,1	1,45±0,1	11,1±1,3	10,9±0,4	284±25	284±21
Стрес	1,6±0,1	2,5±0,2*	12,0±0,8	18,7±1,7*	295±30	371±27*
Каротин+С	1,7±0,1	1,9±0,2*	12,1±0,6	17,2±1,4*	290±25	356±21

Аєкол+С	1,8±0,1	1,7±0,1*	11,3±1,1	10,3±0,9**	280±29	299±25*
---------	---------	----------	----------	------------	--------	---------

Примітка: "С"-стрес; **p<0,05 до стресу; * p<0,05 до контролю.

Таблиця 13

Показники імунологічної реакції щурів різного віку при дії стресових факторів та Аєколу

Умови дослід. Групи тварин	Титри Антитіл, Іg		Бляшкоутворення, на 10 ⁶ лейкоцитів		РБТ, %		РОК, %	
	5 міс.	22 міс.	5 міс.	22 міс.	5 міс.	22 міс.	5 міс.	22 міс.
Контроль	4,5±0,5	4,3±0,4	26,4±3,1	26,8±1,8	57,1±6,0	43,2±4,5*	28,1±2,7*	25,9±2,3*
Стрес	4,3±0,4	3,9±0,4	23,5±2,2	20,8±2,2	53,2±5,6	32,4±2,2*	30,2±3,3*	20,3±2,1*
Стрес+ Аєкол	4,2±0,3	3,5±0,2	26,8±2,8	28,5±3,1	68,1±4,7*	48,1±3,4**	35,6±2,6*	32,2±3,8*
Стрес+ каротин	3,9±0,2	4,4±0,5	24,0±2,6	23,7±2,8	56,2±5,8	35,2±3,1*	31,3±3,4*	26,6±3,4*

*p<0,05; до контролю, * *p<0,05 до стресу

Таблиця 14

Вплив "Аєколу" на проникність клітинних мембран та антиоксидантну активність

Умови дослідів	Вивчаємі показники		
	Кількість ексудату (мл ³)	Білок в ексудаті (%)	МДА в печінці, % до контролю.
Контроль без ліків	3,1 ± 0,5	183 ± 10	152 ± 12
Вольтарен	2,3 ± 0,3	104 ± 11*	104 ± 12*
Аєкол	1,8 ± 0,2*	99 ± 4,2*	103 ± 11*
Каротин	2,9 ± 0,2	157 ± 20	134 ± 20

Високий рівень лікувальної активності "Аєколу" отримано при іспитах на моделі післятравматичного гострого запалення по інтенсивності ексудативного процесу та виділення білка в ексудат (табл.14). Зменшення інтенсивності ексудативного процесу та виходу білка з ним може свідчити про мембраностабілізуючу дію Аєколу, що погоджується з виявленням його антиоксидантних властивостей. Цей факт підтвержується при введенні каротинвмісного препарату старим щурам на протязі 2 місяців, що проявлялось не тільки поліпшенням фізичного стану тварин, але й підвищенням рівня тестостерону в крові та відновленням статевого інстинкту у щурів віком 2,5рока. Останній факт вказує на можливість геропротекторної дії "Аєколу", що може поширити його застосування.

Восьма глава присвячена розробці технологій виготовлення нових

лікарських засобів на основі каротину мікробіологічного.

Полівітамінний олійний розчин “Аскол”. Виготовлення каротинвмісного препарату “Аскол” полягає у змішуванні у реакторах каротину мікробіологічного на соняшниковій або кукурудзяній оліях (згідно до ТУ У18298-95 термін зберігання каротину - бміс.) з жиророзчинними вітамінами та фенольним просторово-утрудненим антиоксидантом 2,6-дитрет.бутил-4-метилфенолом, синергетична взаємодія яких в захисті каротину та ретинолу ацетату в рослинній олії від деструктивного руйнування обґрунтована експериментально, це дозволяє збільшити термін зберігання олійного полівітамінного розчину каротину у 5-6 разів (на технологію виготовлення засобу розроблено та затвержено “Пусковий регламент на виробництво “Асколу”, СТІ 64.0048124101-97 на виробництво вітаміну К3 для Асколу).

При доклінічних випробуваннях на різних моделях захворювань було доведено високу специфічну дію Асколу при лікуванні гастроентерологічних, гінекологічних, проктологічних, стоматологічних захворювань та ран різної етіології (хімічні, термічні та пострадіаційні опіки, хірургічні та побутові травми), розроблено інструкцію по терапевтичному застосуванню препарату. Проведено клінічні випробування в провідних клініках країн СНГ. Розроблено пусковий регламент відповідно ОСТу України, виробництво препарату налагоджено на заводі “Червона зірка” за рішенням Іноваційного фонду України, ПО “Вітаміни (м.Умань), ПО Башбіофарм (м.Уфа).

Каротинвмісний препарат “Капсекол” у м яких желатинових капсулах. Вирішення першочергового завдання щодо стабілізації каротину у вітамінно-олійному розчині при збереженні до 2 та більше років відкрило широкі можливості для розробки нових, раніш не виробляємих в Україні лікарських форм та парфюмерно-косметичних засобів.

Оскільки до складу Асколу входить група жиророзчинних вітамінів, які окислюються при взаємодії з киснем повітря, було вирішено розробити нову лікарську форму у м'яких желатинових капсулах. У фармпромисловості багатьох країн серед дозованих форм ліків препарати у капсулах займають третє місце після таблеток та ампульованих розчинів. Для виготовлення каротинвмісного засобу в капсулах (“Капсекол”) було розроблено склад желатинової маси, яка забезпечує їй необхідну в'язкість, так як цей параметр є основним показником при виготовленні капсул на автоматичній лінії “Leyner” (ХФЗ м. Горький), де проводилась апробація технології. Розроблену желатинову масу з барвником використовували для виготовлення капсул в лабораторних умовах методом мокання. За розробленою технологією у водно-гліцериновій суміші розчиняли консервант з барвником при температурі 333К, охолоджували при перемішуванні до кімнатної температури, після чого завантажували желатин. Після набухання желатину розплавлену масу вакууміювали для позбавлення від кисню 1-1,5 годин. Якість маси контролювали за показниками відносної в'язкості та вологості. В результаті відпрацювання технологічного режиму були підібрані оптимальні параметри для виготовлення якісних капсул по 0,5 г: температура желатинової маси 423-433К, температура охолоджуючого повітря 282-289К, температура маси у розчині 408-418К, маса желатинової оболонки

0,5-0,6 мг, маса олії з БАД 0,45-0,50 г. Якість капсул визначали за терміном розпаду (3-5 хв.), зовнішнім виглядом (тверді, щільні). При апробації технології виготовлення на італійській капсульній лінії “Leuner” були напрацьовані декілька тисяч капсул препарату “Капсекол” за визначеним складом та закладені на тривале зберігання (табл. 15).

Таблиця 15

Динаміка збереження компонентів основних показників в препараті “Капсекол”

Показники	Термін спостережень		
	1 рік	2 роки	3 роки
Вітамін Е, %	99,0 \pm 1,2	93,5 \pm 1,7	90,6 \pm 2,5
Вітамін А, %	96,5 \pm 3,1	92,1 \pm 2,6	87,9 \pm 3,4
Каротиноїди, %	97,8 \pm 3,8	93,0 \pm 5,8	89,5 \pm 6,4
КЧ, мгКОН	0,68 \pm 0,4	0,75 \pm 0,09	1,24 \pm 0,9
ПЧ, %I ₂	0,01 \pm 0,001	0,02 \pm 0,008	0,03 \pm 0,006

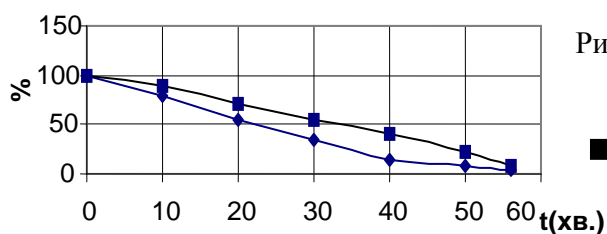


Рис. 7. Окиснення "Капсеколу", після 2 років зберігання (м) - "Капсекол"; "Аекол"

Порівняння стійкості “Аеколу” в капсулах проводили в тоці кисню при Т-343К по окисненню каротину (рис.7.).

Таким чином, замикання каротинвмістивного жиророзчинного розчину на основі рослинної олії у желатинову капсулу сприяє подовженню терміну зберігання препарату. Треба відзначити, що і через 6 років зберігання руйнування каротину в капсулах відзначалось тільки на 20-25%. Це має велике значення, якщо згадати, що термін зберігання “Каротину мікробіологічного” складає 6 місяців. Розроблена НТД на “Капсекол” (ТФС, звіти про доклінічні випробування “Капсеколу” на різних моделях захворювання) були подані до ФК України, одержано позитивний відгук експертної комісії при ФК України, отримано дозвіл на його клінічні випробування. “Капсекол” призначений для лікування гастроентерологічних захворювань та як профілактичний полівітамінний засіб з антиоксидантними властивостями.

Розробка каротинвмістивних супозиторіїв. Базуючись на даних, отриманих при випробуваннях поведінки каротину в твердих жирах, та виходячи з гострої потреби практичної охорони здоров'я України в ефективних лікарських формах, на основі “Аеколу” розроблявся склад супозиторіїв для лікування ураження слизових оболонок в проктології та гінекології, для лікування інфікованих ран. Доклінічні випробування супозиторіїв на моделях проктиту та проктосигмоїдиту довели доцільність використання такого складу (№2): - вітамін U-активована форма метіоніну, механізм дії якого пов'язаний із стимулюванням заживлення слизової оболонки шлунково-кишкового тракту, левоміцетин-обумовлює антимікробну дію у відношенні багатьох видів грампозитивних та грамотришечивних бактерій, полівінілпіролідон пролонгує дію левоміцетину, ане-

стезін забезпечує безпечну дію. Введення до складу супозиторіїв препарату “Аскол” обумовлено його ефективною ранозагоюючою дією. При виборі твердого жиру, як основи супозиторіїв, випробували різні добавки, які забезпечують високу технологічну якість. Апробували основи: 1) твердий жир; 2) твердий жир+2% моностеарат гліцерина (МГС); 3) твердий жир+3% МГС; 4) твердий жир+3% аеросилу+5% моногліцеридів дистильованих (МГД); 5) твердий жир+3% аеросилу+5% МГС; 6) твердий жир +3% аеросилу +3% МГС. В процесі технологічної апробації було виявлено, що основа №6 відповідає заданим в НТД характеристикам засобу. За розробленою технологією до розплавленої основи додавали компоненти, обумовлюючі специфічну дію препарату, перемішували до однорідної маси при Т-301-303К. Після витримання у термостаті впродовж 24 годин супозиторну масу візуально перевіряли на однорідність. Таким чином, для підвищення біодоступності лікарських компонентів до основи введено твердий переестерифікований жир, аеросіл, моностеарат гліцерину. Твердий жир містить транс-олеїнову кислоту, а сполучення її з 3% аеросилу та 3% емульгатору створює найбільш сприятливі умови до рівномірного розподілу тяжко диспергуючих лікарських речовин. Виходячи із того, що підвищення температури та УФ-випромінювання прискорюють розклад левоміцетину та процес окиснення каротиноїдів, були розроблені умови зберігання супозиторіїв, які забезпечують їх стабільність. Нормативно-технічна документація на супозиторії була подана до ФК України.

Розробка складу та технології виготовлення емульсійного препарату в формі аерозолу. Відомо застосування обліпихової олії як олійної фази в комбінації з метилурацилом та етазол-натрієм у пінному аерозольному препараті “Гіпозоль”. Зважаючи на те, що обліпихова олія відноситься до гостро дефіцитної сировини, було запропоновано замінити її у піноутворюючому препараті на основі емульсії першого роду на “Аскол” (“Гіпозоль-А”). При введенні до складу “Гіпозолу-А” - замість обліпихової олії “Асколу” було експериментально обґрунтовано співвідношення основних компонентів. Про стабільність “Асколу” в емульсійному середовищі судили по концентрації каротиноїдів в процесі зберігання (табл.16).

Таблиця 16
Стабільність каротиноїдів в препараті “Гіпозоль-А”. Контроль 100%

Зразки	Термін дослідження		
	8 місяців	18 місяців	26 місяців
“Гіпозоль”	94,3 \pm 10,1	91,5 \pm 7,6	80,1 \pm 6,5
“Гіпозоль-А”	96,6 \pm 8,3	95,7 \pm 8,4	92,5 \pm 7,3*

* $p < 0,05$; до “Гіпозолу”

Більш висока ступінь зберігання каротиноїдів в “Гіпозолі-А” при застосуванні “Асколу” замість олії обліпихи обумовлена наявністю в його складі групи антиоксидантів, захищаючих каротин від руйнування. Як емульгатор була використана комбінація твіну-80 (емульгатор 1 роду) із спиртами синтетичними жирними фракції С₁₆-С₂₁, яка сприяла можливості одержання стабільної емульсії. При доклінічних випробуваннях було встановлено, що оптимальна концен-

трація “Асколу” в емульсії для забезпечення ефективної регенерації тканин та протизапальної дії повинна складати 15-30%. При застосуванні 30% концентрації “Асколу” основні параметри фармакокінетики лікарських речовин (етазол натрія) практично не змінюються.

Таким чином, до складу препарату “Гіпозоль-А” ввійшли: “Аскол”-15,0; метилураціл - 1,0; етазол-натрію -1,0; твін-80 - 1,2; спирти синтетичні жирні фракції C₁₆-C₂₁ - 2,3; пропіловий естер п-оксibenзойної кислоти - 0,05; спирт етиловий 95% - 0,25; вода дистильована - 29,2; хладон-12 - 7,0%, що забезпечувало ранозагоюючу та бактеріостатичну дію у відношенні до багатьох мікроорганізмів (стафілококів, протей, кишкової палички) при інфікованих ранах.

Був напрацьований пакет НТД (ТФС 42-1421-87, 42-2032/90, звіт про доклінічні випробування), що подано до ФК України. Технологія виготовлення препарату “Гіпозоль-А” (регістрац. номер 91/146/6) випробувана на ПО “Алтайвітаміни”, виробляється на підприємстві при ХФЗ “Здоров’є трудящих”. Розробка захищена авторським свідоцтвом №1681420 А1 від 21.02.91 р.

Розробка парфюмерних засобів з каротином. Відомо, що слизова тканина ротової порожнини уражується мікроорганізмами, що призводить до погіршення стану зубів. Складний механізм пародонтозу досі не дозволяє розробити оптимальний препарат для його лікування. Виходячи із положення, що до складу “Асколу” входить капіляростабілізуючий антигеморагічний вітамін К₃ та протизапальні жиророзчинні компоненти, при розробці складу зубної пасти додавалось 0,5% “Асколу”, а як біологічно-активні домішки - ефірні олії лаванди або монарди для антимікробної активності препарату. Протизапальна дія обумовлюється введенням до складу пасти екстрактів трави душиці, ногітків, черемухи, кореня змійовика, які відігравали також роль захисників каротину від окиснення. Ці ж добавки сприяли захисту слизових оболонок рота від подальшого ураження (знижувалась кровотеча та нестабільність зубів у щелепах). Зубна паста була випробувана в клініці Одеського інституту стоматології.

Стабільність каротину в основі зубної пасти визначалась методом автоокислення при Т-293К. Каротин у пасті, яка являла собою желе, не руйнувався на протязі 21 місяця (рис. 8).

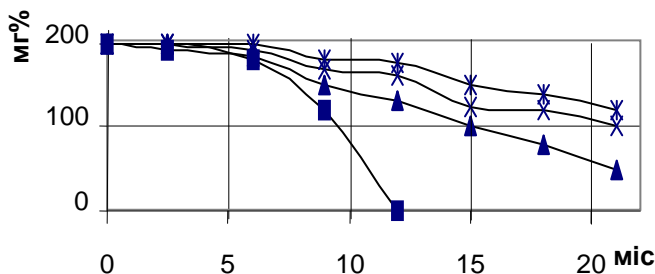


Рис. 8. Окиснення каротину у складі зубної пасти,

Таким чином, каротин у желеподібній масі, стабілізований групою антиоксидантів, був захищений від руйнування на протязі 21 місяця проти б-и у контролі. Випробування зубної пасти з каротином на хворих на базі Одеського стоматологічного інституту підтвердило лікувально-профілактичну дію пасти з стабілізованим каротином мікробіологічним.

Розробка модифікації методики одночасного визначення жиророз-

чинних вітамінів А, Е та каротину в “Асколі”. В зв'язку з необхідністю нових сучасних методик для визначення компонентів в лікарських препаратах (каротину та вітамінів в “Асколі”) в фармакопейну статтю (ФС) окрім традиційних методів, (з бігом часу ці методи застарівають, віднімають багато часу та не відповідають сучасності) було розроблено сучасну модифікацію методики аналізу “Асколу” без омилень при застосуванні вискоєфективної рідинної хроматографії з розділом трьох компонентів на сілікагельній колонці в різних рухомих фазах. Були вибрані елюенти в відповідних співвідношеннях. На рис.9 зображені хроматограми, одержані при послідовному введенні 6-ти проб “Асколу” з використанням елюента н-гексан-ізопропанол, вибраного як робочу рухому фазу, при внутрішньому стандарті – халконі.

Рис.9. Розділення компонентів “Асколу” при послідовному введенні 6-ти проб р-зчину.

1...6 – номер послідовних введень проб К-каротин, А-ретинолаце-тату, Е-токоферилацетату, М-вітаміну К₃ П-компоненти соняшникової олії. 1-3 -через 1 рік, 4-6 –через 2 роки.

Таким чином, розроблена на основі вискоєфективної рідинної хроматографії модифікація методики (а.с.1608579). підтверджує стабільність каротину мікробіологічного через 2 роки збереження при введенні до його складу групи синергетично діючих антиоксидантів. Отримані методом вискоєфективної рідинної хроматографії показники складу каротинвмістивного препарату підтверджують стабільність всіх компонентів біологічно активних речовин, що входять в препарат, на протязі 2 років

В дев'ятому розділі розглянуто нові антиоксиданти для стабілізації каротинвмістивних сполук. Для підвищення стабільності “Асколу” були випробувані нові антиоксиданти: пірозан-1, пірозан-2, фенозан-кислота та її похідні (фенозан-23, фенозан-28); пірозани призначені для стабілізації олії, фенозани - для стабілізації каротину та вітаміну А.

1. 1,4-дітрет.бутіл-пірокатехін (пірозан-1)

2. 1,5-дітрет.бутіл-пірокатехін (пірозан-2)

3,4-гідроксі-3,5-дітрет.бутіл-
-феніл бротонова кислота
(фенозан-кислота), фенозан-23, 28 -
її естери

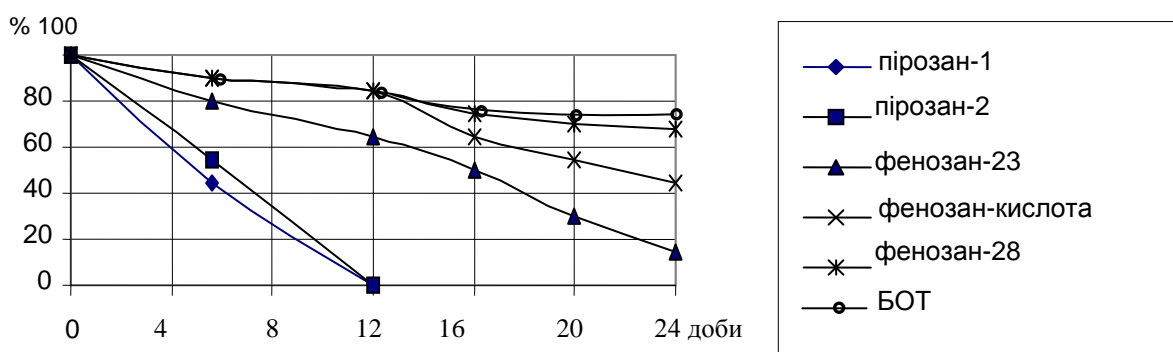


Рис. 10. Вміст каротиноїдів в "Асколі" з новими АО при окисленні, t зберігання 293К

Порівняння антиоксидантної активності нових АО проводили при окисленні "Асколу" киснем повітря в порівнянні з БОТ. Про ступінь захисту судили за витратами каротиноїдів (рис. 10). Найбільш активною із вивчених фенозанів виявилась фенозанова кислота, різниця від впливу її естерів була незначна. Треба визначити, що ефективність БОТ була вища ніж у похідних фенозанової кислоти, яка може бути перспективним АО в захисті каротину від окислення.

ВИСНОВКИ

Дисертація присвячена вирішенню актуальної народно-господарської проблеми щодо стабілізації каротину мікробіологічного, отриманого біотехнологічним способом, від окислення у природних жирах з метою створення на його основі ефективних каротинвмістних засобів, які разом з високими лікувальними властивостями згідно з міжнародними стандартами повинні мати довгі терміни зберігання. Вирішення проблеми дозволило на основі мікробіологічного каротину створити нові високоефективні продукти з лікувально-профілактичною дією.

1. Показано, що антиоксиданти та прооксиданти при їх введенні до середовища культивування біомаси мукорового грибу змінюють каротиногенез, ліпидоутворення, але не знижують рівень окислення кінцевого продукту біосинтезу-каротину та співвідношення ненасичених жирних кислот.

2. Експериментально обґрунтовано групу біологічно активних антиоксидантів, які у синергізмі з фенольними синтетичними антиоксидантами збільшують термін збереження каротину мікробіологічного з 6-ти місяців до 2-х та більше років із збереженням структури, фізико-хімічних властивостей та біологічної дії. Показано, що виявлена група антиоксидантів інгібує ланцюгові вільно-радикальні реакції окислення відриваючі ланцюги по реакції з пероксидними радикалами

3. Доведено, що обґрунтована група антиоксидантів є універсальною і захищає каротин мікробіологічний від окислення в рослинних оліях, твердих жирах та їх сполуках. Отримані параметри – стехіометричний коефіцієнт інгібування f (1,5-3,2 відн. од.) та константа $K_7/\sqrt{k_6}$ (5,0-201,0 л/моль с) дають змогу виявити

антирадикальну активність інгібіторів при створенні препаратів на основі твердих жирів. Ступінь антиоксидантного захисту каротину в жирах залежить від рівня їх перексидації. Вивчена група антиоксидантів стабілізує каротин мікробіологічний від деструктивного руйнування також в емульсійних розчинах типу о/в.

4. Встановлено стабілізуючу дію природного антиоксиданту карнозину в захисті каротину в харчових жирах від окислення.

5. Показано антиокислювальну активність нових антиоксидантів фенозанової та пірозанової груп та їх похідних в захисті каротину мікробіологічного на рослинних оліях від окислення.

6. Доведено, що на основі каротину мікробіологічного, рослинних олій та жирів, які мають терміни зберігання до 1 року, можна розробляти нові лікарські препарати із терміном зберігання 2 та більше років при умові їх стабілізації обгрунтованою групою антиоксидантів.

7. В дослідях на тваринах доведено збереження біологічної активності у стабілізованого каротину мікробіологічного протягом 2-х років. Проведено вивчення біохімічних показників та терапевтичної активності після 2 років збереження препаратів, що підтверджується клінічними випробуваннями..

8. На основі стабілізованого каротину мікробіологічного розроблено:

-склад та технологію виробництва препарату АЄКОЛ на основі рослинної олії для лікування гастроентерологічних захворювань та ран різної етіології. Випуск препарату налагоджено на ХФЗ "Червона зірка" (м.Харків, Україна), на ХФЗ ПО "Вітаміни" (м.Умань, Україна), на ХФЗ ПО "Башбіофарм (м.Уфа, Росія), патент України №2384,

-склад та технологію виробництва препарату "ГІПОЗОЛЬ-А" – емульсійного піноутворюючого препарату в аерозольній формі для лікування інфікованих ран. Випуск препарату налагоджено на ХФЗ "Здоров'я трудящих" (м.Харків, Україна), на ХФЗ ПО "Алтайвітаміни" (м.Бійск, Росія), а.с.1682420;

-склад та технологію виробництва каротинвмістивного препарату "КАПСЕКОЛ" у м'яких желатинових оболонках для лікування гастроентерологічних захворювань, вітамінної та антиоксидантної недостатності. Препарат рішенням Фармкомітету України допущено до клінічних випробувань, патент України № 3769-Х11,

-склад та технологію виготовлення продуктів бісквітного виробництва з лікувально-профілактичною дією, розроблено технологічну інструкцію на виробництво продукції ("АТЗТ" Бісквітна фабрика", м. Харків).

-склад та технологію виготовлення парфюмерно-косметичних засобів з лікувально-профілактичною дією.

9. Запропоновано нову модифікацію методики визначення жиророзчинних вітамінів А, Е, К та каротину у каротинвмістивних оліях з використанням вискоефективної рідинної хроматографії.

Основний зміст дисертації опубліковано в наступних роботах

1. Кричкова Л.В. Химия, биохимия и технология биологически-активных каротинсодержащих средств на основе растительных масел и жиров. – Харьков: ХФТИ, - 1997. - 211с. Ни

2. Кричковская Л.В., Донченко Г.В., Чернышов С.И., Никитченко Ю.В. Жуков В.И. Природные антиоксиданты: биотехнологические, биологические и медицинские аспекты. – Харьков: “Дизайн-проект”, - 2001. – 378с.

3. Кричковская Л.В., Кунщикова И.С., Мартыновский В.П., Донченко Г.В., Кунщикова Е.Н., Чернышов С.И. Биотехнология каротина: селекция, синтез, биохимия, экология применение в медицине и животноводстве.- Харьков: “Дизайн-проект”, - 2003 –287с.

4. Кричковская Л.В. Аекол. - М.: НПО Минмедэкономика, - 1989. – 25 с.

5. Кричковская Л.В., Пашук А.Ю., Кострикова Э.В., Северцев В.А. Аекол - аналог облепихового масла // Новые лекарственные препараты. - М., - 1988. - Вып.3.- С. 4-7.

6. Кричковская Л.В. Результаты экспериментального и клинического изучения Аекола. Сообщение II // Новые лекарственные препараты. -М., 1989. - Вып. 8. - С.14-19.

7. Староверов В.М., Дейнека В.И., Кричковская Л.В. Нормально-фазовая микроколочная ВЭЖХ. Определение витаминов А,Е,К₃ при их совместном присутствии в масляных растворах // Хим. фарм. журн. – 1990. -№9.- С.85-86.

8. Кричковская Л.В., Дементий Р.Н., Зябченкова А.К. Изучение антиоксидантных свойств облепихового масла и его аналога препарата “Аекол” // В кн.: “Новое в биологии, химии, фармакологии облепихи”. – Новосибирск: Наука, Сибирское отд. АН СССР, - 1991. - С.145-147.

9. Кричковская Л.В., Потапова С.И., Зябченкова А.К. Применение облепихового масла и его аналога препарата “Аекол” для лечения стоматологических заболеваний // В кн.: “Новое в биологии, химии, фармакологии облепихи” –Новосибирск: Наука, Сибирское отд. АН СССР, - 1991. - С.141-144

10. Кричковская Л.В., Чибилев Т.Х., Вайнштейн В.А., Северцев В.А., Ляпунов Н.А. Исследование и обоснование состава каротинсодержащего препарата с антибактериальным и противовоспалительным действием в аэрозольной форме // Новые лекарственные препараты .- М., -1997.- Вып.1.- С.10-12.

11. Кричковская Л.В. Повышение биологической ценности и стабильности каротинсодержащего масла // Вестник ХГПУ. –Харьков.-Вып. 12. –1998. -С.194-196.

12. Кричковская Л.В. Применение жирорастворимых антиоксидантов при стрессах. // Вестник ХГПУ. -2000 .-Вып. 123. -С.119-121.

13. Кричковская Л.В. Стабилизация каротиноидов и витамина А в масляных растворах // Вестник ХГПУ.- Харьков. -1998. – Вып.12. - С.191-193.

14. Кричковская Л.В. Синергетическое действие антиоксидантов при стабилизации поливитаминных препаратов на основе жиров // Вестник ХГПУ.-Харьков. –1998. -Вып.16. -С.132-134.

15. Кричковская Л.В. Защита каротинсодержащих препаратов методом капсулирования // Вестник ХГПУ. –Харьков. - 1998. – Вып.12. - С.188-190.

16. Кричковская Л.В. Выбор синергетических пар антиоксидантов в защите каротина от окисления в жирах // Вестник ХГПУ. – Харьков. - 1998. – Вып. 23. - С.79-81.

17. Кричковская Л.В. Выбор метода стабилизации сложной липидной си-

стемы // Вестник ГХПУ. о– Харьков. –1998. - Вып. 16. – С.135-139.

18.Кричковская Л.В., Осейко Н.И., Коваленко А.О. Применение биологически активных веществ в бисквитном производстве // Вестник ХГПУ. -Харьков. – Вып. 12. – 1998. - С.185-187.

19.Кричковская Л.В. Стабилизация каротинсодержащего поливитаминного препарата // Вестник ХГПУ.-Харьков. –1998. - Вып. 16. – С. 128-131.

20.Кричковская Л.В., Черненькая Л.А. Расчетные методы спектрофотометрического анализа многокомпонентного каротинсодержащего препарата /Вимірювальна та обчислювальна техніка в технологічному процесі. Зб. наук. праць. – Хмельницький.- 2001, в.№8.-С.

21.Кричковская Л.В., Кунщикова Е.А. Регуляция биосинтеза каротина при культивировании *Blakeslea trispora* // Вісник Луганського державного пед. універ. ім.Т.Г.Шевченка. – 2001. –№6 (38). – С.111-116.

22.Кричковская Л.В., Донченко Г.В., Кунщикова Е.А. Синтез каротиноидов в биомассе гриба *Blakeslea trispora* в присутствии витаминов и микроэлементов // Вісник проблем біології і медицини. –2001. -№2. – С. 18-22.

23.Кричковская Л.В., Кунщикова Е.А. Усовершенствование регуляции каротиногенеза в биомассе мукорового гриба // Вісник Донецького держ. університету. Природничі науки. – 2001. -- Вып. 1. – С. 260-264.

24.Кричковская Л.В. Биомасса *Blakeslea trispora* - экологически чистый источник биосинтеза каротина // Вісник агроєкологічної академії України. – 2001. -№1. – С. 184-187.

25.Кричковская Л.В., Кунщикова Е.А. Каротиногенез как индикатор состояния биомассы микрогрибов *Blakeslea trispora* // Питання біоіндикації і екології. –2001. –Вып.6, №2. –С.114-121.

26.Кричковская Л.В., Кунщикова Е.А. Влияние антиоксидантов и прооксидантов на выход каротиноидов у мукорового гриба *Blakeslea trispora* // Вісник Сумського держ. універ. –2001. -№5.- С.115-119

27.Кричковская Л.В., Лукашова О.П., Мамотюк Е.М. Влияние аекола-препарата с антиоксидантными свойствами – на функциональное состояние старых крыс // Проблемы старения и долголетия. – 2001. –Т.10, №1. – С. 27-32.

28.Кричковская Л.В. Применение антиоксидантных препаратов при холодной адаптации // Проблемы криобиологии. - 2001. - №2.- С. 45-48.

29.Кричковская Л.В., Кунщикова И.С. Регуляция каротиногенеза в биомассе мукорового гриба // Агроєкологічний журнал. - Київ. – 2002. - №1. – С. 67-69.

30.Кричковская Л.В. Биологическая активность стабилизированного каротина микробиологического // Вісник Дніпропетровського держ. університету. –Серія: Біологія і екологія. – 2001. –Вып.1. – С. 49-54.

31.Кричковская Л.В., Донченко Г.В., Черненькая Л.А. Биологическая активность микробиологического каротина после его стабилизации фенольными антиоксидантами // Вісник проблем біології і медицини. - 2001. - №1. – С. 109-112.

32.Кричковская Л.В. Экспериментальное изучение ранозаживляющего действия Аекола // Медицина сьогодні і завтра. – 2001. – №2. – С. 85-88.

33. Кричковская Л.В. Эффективность каротиноидного препарата в капсулах в геронтологии // Вісник Запорізького держ. універс. Біологічні науки. - 2001.- №1.- С. 169-172.

34. Кричковская Л.В., Зекунова Т.И. Профилактическая регуляция структуры и функционального состояния тканей слизистой желудка при язвенной патологии // Вісник морфології. -2001. - Вып.7, №1. - С. 89-92.

35. Кричковская Л.В. Увеличение антиоксидантного потенциала органов каротинсодержащим препаратом при стрессовых воздействиях // Медицина сегодня и завтра. -№3. -2001. - С. 57-59.

36. Кричковская Л.В., Донченко Г.В. Изменение иммунологической реактивности в разных возрастных группах под влиянием биостимуляторов // Проблемы старения и долголетия. - 2001. - №2. - С. 141-145.

37. Кричковская Л.В., Кунщикова Е. Н. Вплив різних факторів біотехнології на вихід каротину у муковорого гриба *Blakeslea trispora* // Вісник Сумського держ. універ. - 2001. - №5.- С. 119-123.

38. Патент №2384. Украина. Засіб для заживлення ран. Кричковська Л.В., Зябченкова А.К., Черненко Л.А., Северцев В.А. МКИ А 61К31/05,- № 4666069/US, -Заявл. 30.03.89; Оpubл. 26.12.94 //Бюл.№5-1. -1991. - С. 1-2.

39. А.С. №1628281А1 СССР, МКИ А 61 К 31/05, 31/07, 31/355/ 37/02. Ранозаживляющее средство "Аекол". Кричковская Л.В., Зябченкова А.К., Черненко Л.А., Северцев В.А. МКИ А 61К31/05,- № 4666069/US, -Заявл. 30.03.8930- Оpubл. 1991-. Бюл. №5. -8с.

40. А.С. №1681420А1 СССР, МКИ А 61 К 9/12, 31/05, 31/07, 31/355, 37/02. Противовоспалительное средство. Кричковская Л.В., Ляпунов Н.А., Кошелев Ю.А., Башура В.С., Георгиевский В.П., Потапова С.П. - Заявл. 21.02.90, - Оpubл. - 1991.-Бюл. №3 - 6 с.

41. А.С. №1608579 СССР, МКИ G 01 N 33/15, 21/33. Способ количественного определения витаминов А,Е,К₃ в масляных растворах, содержащих каротин. Староверов В.М., Высочина Л.А., Кричковская Л.В., Северцев В.А. - №4403606/30-14; - Оpubл. 23.11.1990,- Бюл. №4 .- 4 с.

42. Патент №3769-Х11 від 23.12.96. Україна. Гастроентерологічний лікарський засіб "Капсекол". Кричковская Л.В., Кричковская Я.В. // Бюл.№4.-1996. - С. 1-6.

43. Кричковская Л.В. Иммунологические аспекты ранозаживления под влиянием биостимуляторов // В сб. ХМИ: Возрастные, адаптивные и патологические процессы в опорно-двигательном аппарате. - Харьков. - 1988. - С.133-135.

44. Кричковская Л.В., Кострикова Е.В. Эффективность нового биологически активного препарата при лечении открытых переломов // В сб.ХМИ. "Факторы и условия оптимизации процессов в организме человека". - Харьков: - 1987. - С. 39-40.

45. Потапова С.И., Кричковская Л.В. Морфологические изменения при лечении экспериментальных язв в полости рта "Аеколом" // В сб. ХМИ "Возрастные, адаптивные и патологические процессы". - Харьков: - 1988. - С.133-136.

46. Кричковская Л.В., Кунщикова И.С., Черненко Л.А. Оптимизация

экологически чистого синтеза -каротина в условиях опытно-промышленного производства. //Сб. науч. трудов XI Международной научно-технической конференции “Экология и здоровье человека. Охрана водного и воздушного бассейнов”. Т.1 Медико- экологические проблемы здоровья человека. 9-13 июня 2003г. г. Бердянск. С.161-167.

47.Кричковская Л.В. Обоснование технологии получения масляно-витаминного препарата с биологически-активными веществами //Труды междунар. науч.-техн.конф. “Информационные технологии: наука, техника, технология, образование, здоровье”. -Ч.4. –Харьков: ХГПУ, 1997. -С.272-276.

48.Кричковская Л.В. Контроль качества жирорастворимых витаминов в масляном растворе //Междунар. науч.-техн. конф. “Информационные технологии: наука, техника, технология, образование, здоровье”. –Ч.4. – Харьков: ХГПУ,- 1997. - С. 268-271.

49.Кричковская Л.В. Выбор масляной основы для каротинсодержащего препарата по физико-химическим показателям. // Труды Междунар. науч.-техн. конф. “Информационные технологии: наука, техника, технология, образование, здоровье”. –Ч.4. – Харьков: ХГПУ, - 1997. - С. 264-267.

50. Кричковская Л.В. Мембрано-стабилизирующее действие аналога облепихового масла “Аекол” // Тез. Всес. симпоз. “Реконструкция, стабилизация и репарация мембран”. М.,- 1989. -С.98.

51.Kritchkovskaja L., Kritchkovskaja J. Antioxidante activity of the new biologically active preparation. // International conference on “Regulation of free radical reaction” - Varna, 13-16 sept. 1989. – P..92.

52.Кричковская Л.В. Изучение иммунологической реактивности в разных возрастных группах под влиянием каротинсодержащих препаратов // Труды Всес.съезда геронтологов. – Тбилиси, 1988. - С. 34-35.

53.Кричковская Л.В., Зябченкова А.К., Черненькая Л.А. Антиоксидантные свойства аналога облепихового масла “Аекола” // Труды III Всес. конф. “Биоантиоксиданты”.-Т.1. – М., - 1989. - С-23.

54.Кричковская Л.В., Кошелев Ю.А., Макеев Г., Башура Г.С. Пенный препарат в аэрозольной упаковке с “Аеколом” // Труды Всес. конф. “Актуальные проблемы создания лекарственных форм с заданными биофармацевтическими свойствами”. – Харьков, 1989. -С.49.

55.Кричковская Л.В., Черненькая Л.А. Применение микробиологического каротина // Сб. науч. трудов III Международной научно-практической конференции “Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія. Ч.2 Медицина. 21-23 травня 2003 року м. Харків. С.268.

56.Ляпунов Н.А., Башура Г.С., Кричковская Л.В.Технологические и биофармацевтические основы создания пенных препаратов в аэрозольных упаковках // Труды Всес. науч. конф. “Состояние и перспективы создания новых готовых лекарственных средств и фитохимических препаратов”. –Харьков, 1990. - С.58-59.

57.Кричковская Л.В., Подгорная Н.Б., Жукова Н.В., Завгородний И.В. Антиоксидантные эффекты стабилизированного каротина микробиологического при экстремальных воздействиях. //Сб. науч. Трудов XI Международной науч-

но-технической конференции “Экология и здоровье человека. Охрана водного и воздушного бассейнов”. Т.1 Медико-экологические проблемы здоровья человека. 9-13 июня 2003г. г. Бердянск. С.168-171

АНОТАЦІЯ

Кричковська Л. В. "Створення біологічно-активних продуктів на основі стабілізованого каротину біотехнологічного походження"-Рукопис.

Дисертація на здобуття вченого ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 “Біотехнологія”. Інститут біохімії ім О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2003р.

В дисертації вирішена проблема стабілізації каротину з мукорового мікрогриба *Blakeslea trispora* від деструктивного окислення у природних жирах з метою збільшення термінів збереження у декілька разів без втрати біологічної активності при створенні на його основі ефективних каротинвмісних препаратів. Для цього запропоновано використання групи антиоксидантів, до якої увійшли α -токоферол, просторово-утруднений фенольний АО – бутилокситолуол, (який захищав каротин від деструктивного руйнування ефективніше, ніж вивчений поряд з ним бутилоксіанізол, фенозан кислота та її похідні, та АО з групи пірозанів) та 2-метил-1,4-нафтохінон. Експериментально доведено, що стійкість розчину каротину від деструктивного руйнування в олії додає сумісна присутність 2-метил-1,4-нафтохінону, α -токоферолу та 2,6-дитрет-4-метилфенолу у визначеному співвідношенні, збільшується з 6-ти міс. до 2 років. Запропоновані шляхи стабілізації каротину від руйнування із збереженням фізико-хімічних властивостей та специфічної активності з 6 місяців до 2 та більше років відкривають широкі можливості для створення каротинвмісних лікарських препаратів, харчових та парфюмерно-косметичних засобів, які відповідають світовим стандартам. Основні результати праці знайшли промислове впровадження у виробництві нових каротинвмісних продуктів, які раніш не вироблялись, що послужило поштовхом для інтенсифікації біотехнологічного отримання каротину. Розроблено склад та технології виготовлення каротинвмісних засобів: на рослинній олії- “Аєкол” (рег. № 87/295/3), в аерозольній формі - “Гіпозоль-А” (рег. №91/146/6), на основі жирів - супозиторії “Вітакол”; у м'яких желатинових оболонках - “Капсекол”. “Аєкол” та “Гіпозоль-А” виробляються на хімфармпідприємствах Росії та України, інші препарати отримали дозвіл на клінічні випробування.

SUMMARY

L.V. Krichkovskaya "The creation of biologically active products on the basis of the stabilized carotene of biotechnological origin"- Manuscript.

The thesis to participate in the competition for getting the scientific degree of the Doctor in biological sciences in the specialty 03.00.20- "Biotechnology". O.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine Kiyv, 2003.

The thesis is dedicated to the solution of the actual national economic problem on stabilization of microbiological carotene from oxidation in natural adespes with the purpose of new highly efficient products creation on the basis of the domestic raw

materials of new high efficient carotene containing products for a pharmaceutical, alimentary and perfumery industries.

The problem of carotene stabilization in adesees was solved by the selection of synergetically acting groups of antioxidants AO, the following components have been included to the content: α -tocopherol, spatially-hard phenol antioxidant - 2,6-dithret.buthyl-4-methylphenol and 2-methyl-1,4-naftokhynon. The induction period for carotene in vegetable oil at autonomic oxidation and oxidation in the oxygen current at various temperature regimes was considerably higher in the presence of 2,6-dythret.buthyl-4-methylphenol (BOA), than 2-tributhyl-4-methylphenol (BOA) at simultaneous presence in the lipid solution of 2-methyl-1,4-naftokhynon. The carotene destruction at various kinds of oxidation considerably reduced also in the presence of 4-hydroxide-3,5-dythret-buthyl-phenyl-brothon acid and its derivatives. Antioxidant nature of the phenozan-acid was comparable as to the carotene stabilization efficiency in the oil solution with BOT. The pirozans, studied along with the above mentioned antioxidants, were less effective regarding the stabilization of the multivitamin lipid system and carotene. It was shown at oxidation of alimentary adesees "Prima", "Friturny", "Confectionery" in the reaction of the originated oxidation of kumol, that the introduction of α -tocopherol and antioxidant of an animal origin - carozene (β -alanin-L-hystidin) into the fat mixture result in the induction period increasing and considerably inhibited the carotene destruction. Carozene has also the antistress activity, that's why its introduction into the alimentary adesees not only as antioxidant, but also as active biological additive, acting as antistress factor along with carotene, is actual at the development of treatment and prophylactic food products. The terms of carotene preservation and the palmitate retinolum considerably increased at combined application of α -tocopherol; 2-methyl, 1,4-naphthoquinone, 2,6-dythret.buthyl-4-methylphenol in firm adesees and their mixtures. The studied group of AO in fatty basis of Gorky ChPhP, in which the carotene as for the physical-chemical indexes corresponded the input data for more continuous period, saving its medical properties within the storage period (2-2,5 years), has exhibited the greatest stabilizing role for carotene. The carotene protection against oxidation with the preservation of the specific activity during a long term opens the broad capabilities for the creation of carotene containing products in various industries (pharmaceutical, alimentary, perfume-cosmetic). On the basis of the obtained experimental data the contents and technologies of pharmaceutical drugs obtaining have been designed on the basis of the stabilized microbiological carotene: a) the oily multivitamin drug "Aekol" (registration No 87/295/3; b) solvent drug in the aerosol vat "Hypozol-A" (registration No 91/146/6; c) suppository "Vitakol" (NTD was adopted by the FC of Ukraine); d) the drug in mild gelatinous capsules "Capsekol" (the FC decision for the realization of clinical tests has been obtained). The drugs "Aekol" and Hypozol-A" are manufactured by the plants of Ukraine and Russia.

The carotene protection against oxidation in firm adesees, including confectioner's ones has allowed to elaborate not only the medicinal forms, but also the technological instruction for the manufacture of food products. The technological conditions, fostering the preservation of physical-chemical parameters while transferring the manu-

ufacture of the designed products from the laboratory to the industrial conditions were found out and substantiated.

The main results of the work have been implemented into the manufacture of new medicinal drugs, which were not produced in Ukraine earlier, as well as alimentary and perfume-cosmetic products with the treatment and prophylactic action.

АННОТАЦИЯ

Кричковская Л.В. "Создание биологически активных продуктов на основе стабилизированного каротина биотехнологического происхождения". –Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.20-биотехнология. Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины, Киев, 2003.

Диссертация посвящена решению актуальной народно-хозяйственной проблемы по стабилизации каротина биотехнологического происхождения (из биомассы мукорового микрогриба *Blakeslea trispora*) от деструктивного окисления в природных жирах с целью увеличения сроков его хранения в несколько раз без потери биологической активности для создания на основе отечественной сырьевой базы новых высокоэффективных каротинсодержащих продуктов для фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности. Проблема стабилизации каротина в жирах решалась подбором синергетически действующей группы антиоксидантов (АО), в которую вошли: α -токоферол, пространственно-затрудненный фенольный антиоксидант – 2,6-дитрет.бутил-4-метилфенол и 2-метил-1,4-нафтохинон. Индукционный период у каротина в растительном масле при автоокислении и при окислении в токе кислорода при разных температурных режимах был значительно выше в присутствии 2,6-дитрет.бутил-4-метилфенола (БОТ), чем 2-трет.бутил-4-метилфенола (БОА), при одновременном присутствии в липидном растворе 2-метил-1,4-нафтохинона. Деструкция каротина при разных видах окисления значительно снижалась также в присутствии 4-гидрокси-3,5-дитрет-бутил-фенил-бртоновой кислоты и ее производных. Антиоксидантный характер фенозан-кислоты был сравним по эффективности стабилизации каротина в масляном растворе с БОТ. Изученные наравне с вышеперечисленными антиоксидантами пирозаны оказались менее эффективны в отношении стабилизации каротина в поливитаминной липидной системе.

При сочетанном применении в твердых жирах и в их смесях α -токоферола; 2-метил, 1,4-нафтохинона, 2,6-дитрет.бутил-4-метилфенола, значительно увеличивались сроки сохранности каротина и ретинола пальмитата. Наибольшую стабилизирующую роль для каротина проявила исследуемая группа АО в жировой основе горьковского ХФЗ, в которой каротин по физико-химическим показателям соответствовал исходным данным более продолжительное время, сохраняя на всем протяжении хранения (2-2,5 года) лечебные свойства.

Разработанные способы защиты микробиологического каротина – продуцента микрогриба *Blakeslea trispora* от окисления с сохранением специфической активности на протяжении длительного срока открывают широкие возможности для создания каротинсодержащих продуктов в разных отраслях промышленно-

сти (фармацевтической, пищевой, парфюмерно-косметической). На основе полученных экспериментальных данных были разработаны составы и технологии получения таких фармацевтических препаратов на базе стабилизированного каротина микробиологического: а) масляный поливитаминный препарат “Аекол” – для лечения гастроэнтерологических, проктологических, стоматологических, гинекологических заболеваний и ран разной этиологии (регистрационный №87/295/3; б)противовоспалительный препарат в аэрозольной форме “Гипозоль-А” – для лечения инфекционных осложнений (регистрационный №91/146/6; в) суппозитории “Витакол” для лечения проктологических и гинекологических инфицированных поражений слизистой (НТД принята Фармкомитетом Украины); г) препарат в мягких желатиновых капсулах “Капсекол” для лечения гастроэнтерологических заболеваний (получено решение Фармкомитета на проведение клинических испытаний). Стабилизация каротина в гелеподобной структуре позволила разработать технологию получения лечебно-профилактической зубной пасты для профилактики поражений слизистой оболочки полости рта и пародонтоза. Защита каротина от окисления в твердых жирах, в том числе кондитерских, позволила разработать технологическую инструкцию на производство бисквитных изделий с приданием им лечебно-профилактических свойств. Разработанные технологии апробированы и внедрены на химико-фармацевтических заводах Украины и России. Разработаны промышленные и пусковые регламенты на выпуск препарата “Аекол” (ПО “Башбиофарм”, Россия; ХФЗ “Червона зірка”, Украина); опытно-промышленный регламент на “Гипозоль-А” (ПО “Алтайвитамины”, Россия; ХФЗ “Здоровье трудящихся, Украина), лабораторные регламенты на препараты “Капсекол” и “Витакол” в соответствии с отраслевыми стандартами. Технологии изготовления новых препаратов отвечают экологическим требованиям. Основные результаты работы нашли внедрение в производстве новых лекарственных препаратов, которые ранее не производились, что позволило также увеличить производство каротина биотехнологического происхождения.