



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75307** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
C12N 13/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 06203	(72) Винахідник(и): Маринченко Віктор Опанасович (UA), Ніжельська Олена Ігорівна (UA), Макара Володимир Арсенійович (UA), Якунов Андрій Васильович (UA), Маринченко Лоліта Вікторівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 23.05.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.11.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.11.2012, Бюл.№ 22	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Володимирська, 68, м. Київ-33, 01601 (UA), НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ФІЗИКО-ХІМІЧНЕ МАТЕРІАЛОЗНАВСТВО" КИЇВСЬКОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА ТА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Володимирська, 64, м. Київ-33, 01033 (UA), НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ "КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ", пр. Перемоги, 37, м. Київ-56, 03056 (UA)

(54) СПОСІБ АКТИВАЦІЇ ЧИСТОЇ КУЛЬТУРИ ЗАСІВНИХ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

(57) Реферат:

Спосіб активації чистої культури засівних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* включає приготування суспензії клітин в стерильній воді та обробку її електромагнітним випромінюванням міліметрового діапазону довжин хвиль нетеплової потужності. Суспензію клітин дріжджів у стерильній воді готують в пропорції (1:8) - (1:12) в закритій ємності з плоским дном, охолоджують до температури +2 ...+6 °С, поки клітини осядуть рівномірним шаром на дно ємності, а електромагнітне випромінювання активуючої частоти 41,76 ГГц подають знизу на шар суспензії клітин.

UA 75307 U

Корисна модель належить до біофізики, мікробіології, може бути використана у біотехнологіях. Активация культур дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* є важливою для прискорення накопичення біомаси, процесів бродіння. Дія біологічно активних частот дає змогу регулювати швидкість поділу клітин, склад продуктів метаболізму дріжджових культур.

Відомо, що електромагнітне випромінювання (ЕМВ) міліметрового діапазону або надвисокої частоти (НВЧ), що відповідає довжинам хвиль від 1 до 10 мм або частотам від 30 до 300 ГГц, нетеплової щільності потужності (до 10 мВт/см²) впливає на життєдіяльність мікроорганізмів, зокрема на дріжджі [Девятков Н.Д. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности // Н.Д. Девятков, М.Б. Голант, О.В. Бецкий. - М.: Радио и связь, 1991.-168 с.]. Переважно опромінюванню піддавали активно зростаючі культури дріжджів, ефективний час опромінювання становив 1-3 години, це пояснюється тим, час впливу ЕМВ НВЧ повинен бути не меншим, ніж тривалість клітинного циклу дріжджів.

За аналог корисної моделі взято спосіб активуючого впливу ЕМВ НВЧ на дріжджі [Гамаюрова В.С., Крыницкая А.Ю., Астраханцева М.И. Влияние ЭМИ КВЧ нетепловой интенсивности на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника.-2004, № 1-2. - С. 117-120]. Чисту культуру дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* раси LK 14 пересівали з "музейного" косяку на чашки Петрі з твердим середовищем, опромінювання культури проводили з використанням генератора ЕМВ з частотним діапазоном 53-78 ГГц. Час опромінювання становив 5 хвилин. Після цього опромінєну культуру пересівали на рідке глюкозо-амонійне середовище та інкубували протягом доби. Виявлено зміни в процесах метаболізму в клітинах дріжджів.

Недоліком аналогу є те, що за опромінювання культури на поверхні агару поглинена НВЧ енергія може призводити до нерівномірного нагрівання клітин, що важко контролювати. Також в цих експериментах культури опромінюють під час їх зростання на поживному середовищі, отже, клітини в культурі знаходяться на різних стадіях росту.

Як найближчий аналог вибраний спосіб активації культур дріжджів [Романова З.М., Косоголова Л.О., Лошицкий П.П. Дослідження впливу електромагнітних опроміненнь радіочастотного діапазону хвиль на активацію дріжджової культури *Saccharomyces cerevisiae*. // Харчова промисловість.-2010, № 9. - С. 22-24]. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* раси 11 вирощували на твердому поживному середовищі за температури +28 °С протягом 24 годин. Змив клітин з твердої поверхні проводили стерильною дистильованою водою і отримували суспензії клітин концентрацією 10⁵ кл/мл. Клітини опромінювали у рідкому стерильному середовищі (дистильована вода). Обробку клітин електромагнітним випромінюванням надвисокої частоти проводили за допомогою генератора "Ораторія-IV" з технічними характеристиками: частота діапазону 57-68 ГГц, спектральна щільність шуму 10⁻¹⁸ Вт/Гц, інтегральна потужність випромінювання 2×10⁻¹⁰ Вт/см², модуляція 8 Гц, та антени для НВЧ опромінювання. Термін обробки становив 5, 10, 15 та 20 хвилин. За наведеними результатами, найбільша активація дріжджів (приблизно у два рази) за кількістю колоній відбувалася у разі впливу ЕМВ НВЧ впродовж 20 хвилин.

Недоліком прототипу є те, що в ньому не враховується стан біологічного об'єкта (культури засівних дріжджів) за впливу слабкого ЕМВ НВЧ, а вважається, що характер реакції культури дріжджів визначається лише режимом опромінювання. Але живі клітини по-різному реагують на слабкі електромагнітні поля залежно від свого початкового стану і комбінації інших фізичних факторів. Зокрема, мікробіологічні культури змінюють свої властивості залежно від температури.

Другий недолік прототипу пов'язаний з тим, що не вказано, як вирішується проблема ефективності дії НВЧ випромінювання на клітини, враховуючи їх досить малу концентрацію у воді. Зазначено лише, що ємність з культурою повинна бути проникною для електромагнітних випромінювань. Як відомо, під час опромінювання ЕМВ НВЧ водяних суспензій, переважна частка енергії поглинається саме у водяному середовищі (плаский шар води товщиною 1 мм послаблює ЕМВ з довжиною хвилі 8 мм у 100 разів, з довжиною хвилі 2 мм - у 1000 разів). За звичайних способів подання випромінювання на суспензію, поглинання в об'ємі зразка буде дуже нерівномірним, і на товщині понад 2-3 мм вже не ефективним. Це накладатиме обмеження на розміри зразків і, відповідно, на можливість використання ефектів НВЧ у біотехнологічних процесах. Створення же спеціальних ємностей (кувет) для обробки ЕМВ міліметрового діапазону рідких зразків потребує додаткових витрат, в тому числі на стерилізацію.

Третім недоліком прототипу є використання для активації культури дріжджів частотної смуги ЕМВ діапазону 57-68 ГГц, а не випромінювання визначеної частоти. Відомо, що біологічні ефекти нетеплового ЕМВ НВЧ мають залежність від частоти, яка встановлюється

експериментальним шляхом. Поряд з активуючими частотами існують такі, що пригнічують життєдіяльність клітин.

В основу корисної моделі поставлено технічну задачу досягти високої сприйнятливості суспензії клітин культури засівних дріжджів до дії електромагнітного випромінювання, створити умови ефективного опромінювання суспензії клітин, коли енергія від джерела ЕМВ НВЧ поглинається, насамперед, клітинами, проводити опромінювання чистих культур дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) на активуючій частоті.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі активації чистої культури засівних дріжджів *S. cerevisiae*, що включає приготування суспензії клітин в стерильній воді та обробку її електромагнітним випромінюванням міліметрового діапазону довжин хвиль нетеплової потужності, згідно з корисною моделлю, суспензію клітин дріжджів у стерильній воді готують в пропорції (1:8) - (1:12) в закритій ємності з плоским дном, охолоджують до температури +2 ...+6 °С, поки клітини осядуть рівномірним шаром на дно ємності, а електромагнітне випромінювання активуючої частоти 41,76 ГГц подають знизу на шар суспензії клітин.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в такому:

1. У разі охолодження чистої культури дріжджів у стерильній воді до температури +2 ...+6 °С всі клітини дріжджів переходять у стан спокою, не ростуть і не поділяються. Завдяки цьому технологічному прийому культура клітин стає синхронізованою за фазою клітинного циклу. Встановлено, що клітини в стані спокою, охолоджені та позбавлені поживних речовин у середовищі, є більш чутливими до дії слабких зовнішніх чинників, яким є нетеплове ЕМВ НВЧ. Клітини чистої синхронізованої культури сприймають зовнішній сигнал ЕМВ однаковим чином, тобто активуюча частота ЕМВ буде такою практично для всіх клітин в суспензії. Опромінювання біологічного об'єкту у визначеному стані є важливим для відтворюваності результатів. Вказаний температурний інтервал для охолодження суспензії є оптимальним, тому що у разі подальшого зниження температури є ризик заморозити і пошкодити клітини, а з підвищенням температури в клітинах активізуються метаболічні процеси (за рахунок використання внутрішніх запасів поживних речовин), що зменшить ступінь синхронізації культури.

2. Приготована в стерильній воді та охолоджена суспензія дріжджів з часом розшаровується: клітини дріжджів мають більшу питому густину, ніж вода, і осідають на дно ємності під дією сили тяжіння. Процеси бродиння відсутні, тому суспензія не перемішується. Таким чином, в ємності формується структура з двох шарів, суспензії та води, і під час подання ЕМВ знизу все воно поглинається клітинами, а шар води зверху не заважає опромінюванню. Суспензію дріжджів готують у пропорції (маса відфільтрованих дріжджів: маса стерильної води) від (1:8) до (1:12) в стерильній закритій ємності. Зручно використовувати конічні скляні колби з ватно-марлевими пробками. Вказаний інтервал пропорцій є оптимальним з технологічної точки зору: за більшої густини суспензії дріжджі утворюють грудки до кількох десятків штук, нерівномірно розподілені в об'ємі, прилипають до внутрішньої поверхні ємності, а у разі занадто рідкої суспензії дії ЕМВ НВЧ піддається менша кількість клітин і опромінювання стає менш ефективним. Менша концентрація суспензії засівних дріжджів підвищує вартість процесу їх активації.

3. Підготовані чисті культури засівних дріжджів *S. cerevisiae* активують дією ЕМВ НВЧ на визначеній активуючій частоті 41,76 ГГц, а не в широкої смузі частот, дія яких може як активувати, так і пригнічувати дріжджові клітини.

Суть способу активації чистої культури засівних дріжджів *S. cerevisiae* полягає в тому, що чисту культуру досліджуваних дріжджів вирощують на стерильному суслі за оптимальної температури протягом 24 годин, після чого дріжджі відфільтровують, готують суспензію дріжджових клітин у стерильній охолодженій воді в пропорції (1:8) -(1:12) (наприклад, 0,5 г відфільтрованих дріжджів стандартної вологості 75 % на 5 мл стерильної води) в стерильній закритій ємності та охолоджують до температури +2 ...+6 °С, впродовж чого клітини дріжджів осідають на дно ємності рівним шаром. Підготовану таким чином чисту культуру дріжджів обробляють електромагнітним випромінюванням міліметрового діапазону довжин хвиль нетеплової потужності активуючої частоти 41,76 ГГц, яке подають знизу на шар суспензії клітин. Опромінювання суспензій чистих культур засівних дріжджів ЕМВ НВЧ зручно проводити за допомогою пристрою (заявка № u201115249, висновок про позитивне рішення на заявку від 10.04.2012 р. Пристрій для обробки суспензій клітин електромагнітним випромінюванням міліметрового діапазону довжин хвиль нетеплової потужності / В.О. Маринченко, О.І. Ніжельська, В.А. Макара, А.В. Якунов, Л.В. Маринченко). Тривалість опромінювання становить від 5 до 10 хвилин. Після опромінювання чиста культура дріжджів у закритій ємності може

зберігатися за температури +2...+6 °C протягом 1-3 діб. Опромінену культуру використовують для зброджування сусла.

- Контрольні (неопромінені) зразки культури дріжджів готують та витримують за таких самих умов. Ступінь активації культури дріжджів після дії ЕМВ НВЧ, тобто швидкість зростання, інтенсивність бродіння, зміни складу продуктів метаболізму визначають у порівнянні з характеристиками неопроміненої культури, вирощеної в таких самих умовах.

В таблицях 1-3 обґрунтовано вибір оптимальних параметрів, які сприяють активації культури засівних дріжджів *S. cerevisiae* ЕМВ НВЧ.

Таблиця 1

Залежність активації чистої культури засівних дріжджів *S. cerevisiae* ЕМВ НВЧ від температури суспензії дріжджів

№ досліджу	Температура суспензії	Результати	Висновки
1	Від 0 °C до 2 °C	Вода частково замерзає. В суспензії спостерігаються пошкоджені і загиблі клітини	Погіршуються технологічні показники подальшого дріжджогенерування
2	Від 2 °C до 6 °C	Культура синхронізована, клітини у стані спокою, відсоток мертвих клітин в межах норми	Однаковий стан дріжджових клітин (стан спокою) створює ефективні умови сприйняття культурою ЕМВ НВЧ
3	Від 6 °C до 10 °C	Окремі клітини готуються до брунькування	Синхронізацію культури порушено, дріжджові клітини неоднаково сприймають опромінювання ЕМВ НВЧ. Активація часткова.

10

Таблиця 2

Залежність активації чистої культури засівних дріжджів *S. cerevisiae* ЕМВ НВЧ від густини суспензії дріжджів

№ досліджу	Густина суспензії, пропорція	Результати	Висновки
1	Від 1:4 до 1:8	Дріжджові клітини утворюють грудки до кількох десятків штук, нерівномірно розподілені в об'ємі, прилипають до внутрішньої поверхні ємності	Не забезпечені умови рівномірного поглинання ЕМВ НВЧ клітинами в суспензії. Це знижує ефективність активації культури.
2	Від 1: 8 до 1:12	Дріжджі формують рівномірний однорідний шар на дні, не прилипають до ємності	Всі дріжджові клітини за опромінювання отримують приблизно однакову дозу ЕМВ НВЧ, що забезпечує ефективність процесу активації культури
3	Від 1:12 до 1:16	Дріжджі утворюють тонкий нерівномірний шар на дні ємності. Засівні дріжджі стандартної густини потрібно додатково розводити водою	Низька ефективність опромінювання. Потрібні додаткові стадії розведення засівних дріжджів та кількість операцій опромінювання, що не технологічно і збільшить витрати на активацію

Таблиця 3

Залежність активації чистої культури засівних дріжджів *S. Cerevisiae* від частоти ЕМВ НВЧ

№ досліджу	Частота ЕМВ НВЧ за оптимальної густини та температури суспензії	Результати	Висновки
------------	---	------------	----------

1	41,74 ГГц-41,75 ГГц	При опромінюванні культури <i>S. cerevisiae</i> зміни на рівні контролю, в деяких випадках - пригнічення зростання	Не є активуючими частотами для дріжджових культур
2	41,76 ГГц	Збільшення концентрації клітин у культурі <i>S.cerevisiae</i> раси XII після інкубації у 2-2,5 рази. Скорочення лаг-фази на 1,5 години. Збільшення накопичення біомаси на 23 % у культурі <i>S.cerevisiae</i> раси М-09, зменшення кількості незброджених вуглеводів у бражці на 19 %. Збільшення підйомної сили хлібопекарських дріжджів на 10 %, глюкозидазної активності - на 7 %, зимазної активності - на 10 %.	Найбільш ефективна активація культури дріжджів за показниками швидкості зростання, ферментативної активності, повноти використання субстрату.
3	41,77 ГГц-41,78 ГГц	Незначні ефекти відносно контролю, деяке пригнічення зростання	Не є придатними частотами для активації дріжджових культур

Технічний результат полягає в такому:

1. Клітини в стані спокою, охолоджені та позбавлені поживних речовин у середовищі, є більш чутливими до дії слабких зовнішніх чинників, яким є нетеплове ЕМВ НВЧ. Завдяки цьому технологічному прийому культура клітин стає синхронізованою за фазою клітинного циклу. Клітини чистої синхронізованої культури сприймають зовнішній сигнал ЕМВ однаковим чином, тобто активуюча частота ЕМВ буде такою практично для всіх клітин в суспензії. Опромінювання біологічного об'єкту у визначеному стані є важливим для відтворюваності результатів.

2. Приготована в стерильній воді та охолоджена суспензія дріжджів з часом розшаровується: клітини дріжджів осідають на дно ємності. Процеси бродиння відсутні, тому суспензія не перемішується. В ємності формується структура з двох шарів (суспензії та води), і у разі подання ЕМВ знизу, все воно поглинається клітинами, а шар води зверху не заважає опромінюванню.

3. Підготовані чисті культури засівних дріжджів *S. cerevisiae* опромінюють на активуючій частоті 41,76 ГГц.

За такого способу активації чистих культур засівних дріжджів після інкубування засівних дріжджів *S. cerevisiae* на стерильному поживному середовищі за оптимальних умов спостерігається: скорочення лаг-фази, збільшення накопичення дріжджових клітин в поживному середовищі, більш ефективно використання дріжджовими клітинами субстрату, позитивний вплив на техніко-економічні показники зрілої бражки, такі як: концентрація біомаси та етилового спирту, кількість виділеного діоксиду вуглецю та кількість незброджених вуглеводів. Такі характеристики відфільтрованих хлібопекарських дріжджів, отриманих після активації ЕМВ НВЧ, як підйомна сила, α -глюкозидазна та зимазна активність - також є вищими.

25 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб активації чистої культури засівних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що включає приготування суспензії клітин в стерильній воді та обробку її електромагнітним випромінюванням міліметрового діапазону довжин хвиль нетеплової потужності, який **відрізняється** тим, що суспензію клітин дріжджів у стерильній воді готують в пропорції (1:8) - (1:12) в закритій ємності з плоским дном, охолоджують до температури +2 ...+6 °С, поки клітини осядуть рівномірним шаром на дно ємності, а електромагнітне випромінювання активуючої частоти 41,76 ГГц подають знизу на шар суспензії клітин.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601