

Корисна модель належить до мікробіології та біотехнології, а саме до способів визначення концентрації біологічно активних продуктів мікробного синтезу, зокрема каротиноїдів, у біомасі дріжджів. Спосіб може бути використаний на підприємствах мікробіологічної промисловості, в медицині, сільському господарстві, харчовій промисловості для визначення вмісту каротиноїдів у клітинах каротиносинтезуючих дріжджів.

Відомі різні способи визначення вмісту каротиноїдів у біомасі каротиносинтезуючих дріжджів, зокрема:

- вирощування клітин каротиносинтезуючих дріжджів спільно з клітинами бактерій для руйнування клітинної стінки ферментами β -(1 \rightarrow 3)-глюканазою, β -(1 \rightarrow 6)-глюканазою, α -(1 \rightarrow 3)-глюканазою, ксиланазою, хітиназою, що їх синтезують бактерії *Bacillus circulans*, з наступною екстракцією ацетоном, переведенням каротиноїдів в петролейний ефір, упарюванням та вимірюванням концентрації на спектофотометрі [Simple Method for the Isolation of Astaxanthin from the Basidiomycetous Yeast *Phaffia rhodozyma* / Johnson E., Villa T., Lewis M., Phaff H. // Applied and Environmental Microbiology. - 1978. - V.35, №6. - P.1155-1159].

- руйнування клітин дріжджів механічними способами за допомогою скляних кульок та розтирання зі склом з наступною екстракцією ацетоном та визначенням концентрації за інтенсивністю поглинання світла на спектофотометрі. [Sedmak J.J., Weerasinghe D.K., Jolly S.O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* II Biotech. Techniques. - 1990. - Vol.4. - P.107-112; Крицкий М.С., Чернишева Е.К., Соболева И.С. Никотинамидные коферменты на ранних этапах световой индукции каротиногенеза в мицелии *Newospora crassa*. // Прикладная биохимия и микробиология. - 1977, - Т.13, вып. 6. - С.901-906].

Недоліком цих способів є їх мала ефективність, недостатня точність оцінки та трудомісткість.

Найбільш близьким по суті рішенням до заявленого способу є „Метод определения содержания каротиноидов в биомассе дрожжей” [Кирилица Е. Направленный синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива их использования: Диссертация доктора биологии: 03.00.23. - Кишинев, 2005. - 129с.], який включає в себе руйнування клітин гідролізом у 1н НСІ впродовж 15хв на водяній бані при температурі 90°C, екстракцію каротиноїдів ацетоном з наступним переведенням в гексан та вимірювання інтенсивності поглинання на спектофотометрі.

Недоліком відомого способу є те, що в результаті гідролізу розчином соляної кислоти частина каротиноїдів окислюється, при цьому не відбувається руйнування усіх клітин для повної екстракції, використання різних розчинників робить процес трудомістким, економічно не вигідним, занижує показники вмісту каротиноїдів у біомасі дріжджів.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки прототипу, забезпечує ефективність та зручність використання, економічність для установ, які будуть його застосовувати.

В основу корисної моделі поставлено завдання - розробити новий спосіб визначення вмісту каротиноїдів у біомасі каротиносинтезуючих дріжджів, що забезпечує точність результату, зручність у використанні, економічно вигідний для установ, що його будуть застосовувати.

Технічний результат досягають тим, що обробку клітин після відмивання здійснюють розчином цетил-3-метил амоній броміду, а екстрагування каротиноїдів проводять етиловим спиртом.

Замість розчину соляної кислоти у заявленому способі використовують розчин цетил-3-метил амоній броміду, що збільшує проникливість клітинної стінки, попереджує руйнування каротиноїдів та сприяє максимальному виходу цих пігментів з клітин при екстрагуванні, підвищує точність визначення концентрації каротиноїдів у біомасі.

Екстракція каротиноїдів етиловим спиртом дає можливість відмовитись від токсичних, дорогих розчинників (петролейний ефір, гексан, ацетон), і тим самим зробити спосіб визначення каротиноїдів зручним у використанні, ефективним та економічно вигідним.

Отже, заявлений нами спосіб забезпечує зручне та надійне визначення каротиноїдів у біомасі каротиносинтезуючих дріжджів і об'єктивну оцінку каротиногенезу культур дріжджів.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку виявлено технічне рішення, в якому є ряд суттєвих ознак, спільних із заявленим рішенням [„Метод определения содержания каротиноидов в биомассе дрожжей” (Кирилица Е. Направленный синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива их использования: Диссертация доктора биологии: 03.00.23. - Кишинев, 2005. - 129с.)]: відмивання біомаси від культуральної рідини, обробку клітин розчином кислоти, екстракція каротиноїдів з клітин розчинниками і визначення концентрації каротиноїдів вимірюванням інтенсивності поглинання світла спектофотометрично.

Однак, наявність зазначених, спільних з прототипом ознак недостатня для отримання технічного результату, який забезпечує заявлений спосіб.

Технічних рішень, які б за сукупністю ознак повністю співпадали б із заявленим способом в доступній патентній і науково-технічній інформації не виявлено. Це дозволяє зробити висновок про відповідність заявленого технічного рішення критерію корисної моделі - „новизна”.

В патентній і науково-технічній інформації не знайдено технічних рішень, в яких були б описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений спосіб від прототипу і забезпечують досягнення технічного результату: обробку клітин після відмивання здійснюють розчином цетил-3-метил амоній броміду, а екстрагування каротиноїдів проводять етиловим спиртом.

Отже, заявлене технічне рішення не випливає явним чином з рівня техніки, що дозволяє зробити висновок про відповідність його критерію корисної моделі - „винахідницький рівень”.

Заявлений спосіб належить до мікробіології та біотехнології, а саме до способів визначення концентрації різних продуктів мікробного синтезу, зокрема каротиноїдів, у біомасі дріжджів. Спосіб може бути використаний на підприємствах мікробіологічної промисловості, в медицині, сільському господарстві, харчовій промисловості для визначення вмісту каротиноїдів у клітинах каротиносинтезуючих дріжджів та вилучення їх з біомаси, а тому відповідає критерію винаходу /корисної моделі/ „промислово придатність”.

Таким чином, заявлене технічне рішення є новим, промислово придатним, має винахідницький рівень, тобто відповідає всім умовам патентноспроможності корисної моделі [відповідно до ст.7 розділу II Закону України „Про охорону прав на винаходи і корисні моделі” №1771-III, 2000 рік].

Відомості, що підтверджують можливість здійснення корисної моделі

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином.

Зважуємо 0,3мг сирової біомаси на торсійній вазі з точністю до 0,0001г і кількісно переносимо в бюкс №2. Вливаємо 5см³ 0,1% розчину СТАВ і ресуспендуємо клітини. Клітини інкубують у цьому розчині 15хв при кімнатній температурі, перемішуючи час від часу скляною паличкою. Після цього клітини осаджують на центрифугі при 3500об/хв та двічі відмивають фосфатним буфером (об'ємом 5см³) до повного вимивання СТАВ.

Відмиті клітини кількісно переносять у скляний бюкс з притертою кришкою, доливають 5см³ 96% етанолу і поміщають у темне місце на 24 години.

Через зазначений час клітини центрифугують при 3500об/хв. Надосадову рідину зливають у баночку з темного скла, а осад переносять у бюкс та заливають 5см³ 96% етанолу. Екстракцію продовжують до повного знебарвлення клітин.

Зібрані екстракти об'єднують в одну пробу. Мензуркою вимірюємо загальний об'єм екстракту (V).

Оптичну густину екстракту вимірюють на фотоколориметрі КФК-3 у кюветі, товщиною 3мм, при довжині хвилі 470нм. Як контроль використовуємо 96% етанол.

Визначають кількість каротиноїдів у розчині за показами КФК-3 (C_{роз}), використовуючи калібрувальну криву, побудовану на біхроматі калію.

Розраховують вміст каротиноїдів у біомасі дріжджів (C) за формулою:

$$C = C_{роз} \times V / M_{сух}, \quad (1)$$

де: C - вміст каротиноїдів у біомасі дріжджів, мг/г сухої маси;

C_{роз} - кількість каротиноїдів у розчині за калібрувальною кривою, мг/см³;

V - об'єм екстракту, см³;

M_{сух} - маса сухих клітин, г.

Результат заокруглюють до сотих. З результатів двох паралельних визначень обчислюють середнє арифметичне і визначають відхилення між кожним результатом та середнім значенням. Допустиме відносне відхилення не повинно перевищувати 10%.

За кінцевий результат приймають середнє значення, заокруглене до сотих.

Приклад конкретного використання способу

Ефективність заявленого способу і його переваги перед прототипом підтверджені прикладом конкретного виконання в умовах лабораторії мікробіологічного синтезу біологічно активних речовин Інституту біології тварин УААН. Метод і результати досліджень наведені нижче.

Схема досліду та результати досліджень наведені в Таблиці 1.

Таблиця 1

Схема досліду

№ п/п	Показники	Способи оцінки	
		Відомий (прототип)	Новий
1	2	3	4
1	Проведено досліджень	Не менше десяти	Не менше десяти
2	Етапи виконання		
2.1	Відмивання біомаси	+	+
2.2	Обробка клітин перед екстракцією	Кип'ятіння в 1л розчині соляної кислоти 15хв на водяній бані при температурі 90°C	Обробка клітин 0,1% розчином цетил-3-метил амоній броміду
2.3	Екстракція	Петролейний ефір, гексан, ацетон	Етиловий спирт 96%
2.4	Колір клітин після екстракції	Слабо рожеві	безколірні
2.5	Визначення інтенсивності поглинання світла	+	+
3	Отримані результати		
	Концентрація каротиноїдів в біомасі дріжджів Phaffia rhodozyma штаму IMB Y-5021, мг/г сухої маси	0,51±0,03	0,83±0,04

З отриманих даних видно, що вилучення каротиноїдів з біомаси каротиносинтезуючих дріжджів за умов використання заявленого способу відбувається на 39% ефективніше у порівнянні з прототипом.

Наведені дані свідчать про перевагу заявленого способу.