

МНОГОФАКТОРНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ОПТИМАЛЬНЫХ ДИАПАЗОНОВ СВЧ-ИЗЛУЧЕНИЯ, АКТИВИЗИРУЮЩИХ РОСТ ДРОЖЖЕЙ

Ананьева Е.П., Богданова О.Ю., Гурина С.В.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет»,
Санкт-Петербург, e-mail: bogdiolg@yandex.ru

Исследование посвящено изучению воздействия СВЧ-излучения на микроорганизмы. Актуальность исследования обусловлена неослабевающей важностью проблемы борьбы с микробами – контаминантами различных материалов, используемых в фармацевтической промышленности. Одним из подходов к снижению контаминации вспомогательных материалов, растительного лекарственного сырья, субстанций является обработка материалов СВЧ-излучением, при которой достигается существенное снижение количества микроорганизмов в обрабатываемых объектах. В процессе исследования деконтаминирующего действия волн СВЧ, в определенных диапазонах низкоинтенсивного СВЧ-излучения отмечали обратный эффект, а именно, стимулирование роста клеток микроорганизмов. Для изучения области стимулирующего действия волн СВЧ-излучения в качестве тест-культур были использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *Rhodotorula rubra*, которые являются объектами биотехнологии. В результате проведения многофакторного эксперимента были установлены оптимальные параметры воздействия СВЧ-излучения низкой плотности мощности, активирующие рост исследуемых дрожжей. Было рассчитано уравнение регрессии и получены следующие оптимальные параметры работы установки: мощность излучения 600 Вт, температура разогрева взвеси дрожжей от 26,0 до 35,0°C, время обработки от 5 до 8 с. Результаты эксперимента могут быть положены в основу исследований по определению оптимальных режимов СВЧ-обработки с целью повышения активности штаммов-продуцентов.

Ключевые слова: микробная контаминация, продуценты, дрожжи, СВЧ-излучение, многофакторный эксперимент, уравнение регрессии

A MULTIFACTORIAL EXPERIMENT IN DETERMINING THE OPTIMAL RANGES OF MICROWAVE RADIATION THAT ACTIVATE YEAST GROWTH

Ananeva E.P., Bogdanova O.Yu., Gurina S.V.

Saint Petersburg Chemical and Pharmaceutical University,
Saint Petersburg, e-mail: bogdiolg@yandex.ru

The study is devoted to the study of the effects of microwave radiation on microorganisms. The relevance of the study is due to the unrelenting importance of the problem of combating microbial contaminants of various materials used in the pharmaceutical industry. One of the approaches to reducing the contamination of auxiliary materials, herbal medicinal raw materials, substances is the treatment of materials with microwave radiation, which achieves a significant reduction in the number of microorganisms in the treated objects. In the process of studying the decontaminating effect of microwave waves, in certain ranges of low-intensity microwave radiation, the opposite effect was noted, namely, stimulating the growth of microbial cells. To study the area of the stimulating effect of microwave radiation waves, yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula rubra*, which are objects of biotechnology, were used as test cultures. As a result of a multifactorial experiment, optimal parameters of the effect of low-power density microwave radiation were established, activating the growth of the yeast under study. The regression equation was calculated and the following optimal parameters of the plant operation were obtained: radiation power of 600 W, heating temperature of yeast suspension from 26.0 to 35.0 °C, processing time from 5 to 8 s. The results of the experiment can be used as the basis for studies to determine the optimal modes of microwave processing in order to increase the activity of producing strains.

Keywords: microbial contamination, producers, yeast, microwave radiation, multifactorial experiment, regression equation

Актуальность исследования обусловлена, с одной стороны, неослабевающей важностью проблемы микробиологической чистоты и профилактики микробной контаминации на фармацевтических и биотехнологических производствах, а с другой стороны, поиском новых возможностей увеличения скорости роста продуцентов и выхода целевого продукта. Избыточное содержание микроорганизмов-контаминантов может вызвать негативные последствия, такие как преждевременная порча готового ле-

карственного препарата, утрата биологически активных компонентов, трансформация активных веществ, риски для здоровья потребителей. Во избежание этих последствий применяют различные методы воздействия на объекты производственной среды, подверженной контаминации: обработка ультразвуком, различными видами излучений и конвективный нагрев [1]. Все методы имеют существенные недостатки (низкая проникающая способность, низкая эффективность, необходимость контролировать

остаточную радиацию, опасность для работающего персонала, изменение физико-химических свойств из-за возникновения термических сопротивлений) [2]. Альтернативой существующим методам обработки материалов с целью улучшения их качества по показателю «микробиологическая чистота» является обработка СВЧ-излучением. Этот метод обладает рядом преимуществ: высокая скорость и равномерность нагрева, экологичность, экономичность за счёт быстроты нагрева, хорошая проникающая способность, эффективность и безвредность для обслуживающего персонала [3]. В процессе исследований по изучению деконтаминирующего действия волн СВЧ-диапазона был отмечен эффект стимулирования роста и активности клеток микроорганизмов при использовании низкоинтенсивного СВЧ-излучения [4, 5]. Учитывая обнаруженный эффект, для определения стимулирующего диапазона воздействия СВЧ-излучения на тестовые микроорганизмы был применен многофакторный эксперимент, важным достоинством которого является его высокая

образцов использовали жидкую питательную среду бульон Сабуро объёмом 25 мл, куда добавляли по 1 мл взвеси дрожжей. Культивирование проводили в колбах объёмом 100 мл, в динамических условиях при частоте вращения колб $n = 100$ об/мин и температуре $23,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ в биореакторе Sartorius Stedim CERTOMAT® STplus [7]. Для определения концентрации клеток в приготовленных взвешях культур и в культуральной жидкости при выращивании обработанных и контрольных образцов дрожжей, использовали метод прямого подсчёта клеток в счётной камере Горяева [8]. Концентрация взвеси дрожжей для обработки составила $6,7 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Увеличение биомассы фиксировали через 24 ч от начала культивирования.

Результаты исследования и их обсуждение

Для эксперимента были выбраны факторы: температура нагрева, мощность работы магнетрона и время обработки, уровни варьирования которых отражены в табл. 1.

Таблица 1

Факторы и уровни их варьирования

Факторы	Температура нагрева, °C	Мощность работы магнетрона, Вт	Время обработки, с
Обозначение	x_1	x_2	x_3
Верхний уровень (+1)	40	900	8
Основной уровень (0)	35	600	6
Нижний уровень (-1)	30	300	4

эффективность и достоверное математическое описание объекта [6].

Цель исследования – определение оптимальных диапазонов СВЧ-излучения низкой плотности мощности на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Rhodotorula rubra* как представителей грибов – объектов биотехнологических исследований.

Материалы и методы исследования

Для обработки СВЧ-излучением низкой плотности мощности использовали культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ У-378 и *Rhodotorula rubra* ВКМ У-341. Для проведения многофакторного эксперимента готовили взвеси дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Rhodotorula rubra* в физиологическом растворе массой $5,00 \pm 0,01$ г каждая в стеклянных пробирках. Перед обработкой определяли начальную температуру каждой пробирки с культурами ($22,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$). Для культивирования обработанных и контрольных

Обработку проводили при постоянном вакууме (остаточное давление в камере 300 мм рт. ст.), благодаря которому удалось достичь точной воспроизводимости температур обработанных образцов. Значения верхнего и нижнего уровня факторов обработки были выбраны исходя из данных литературных источников. Основной уровень воздействия факторов был рассчитан как среднее арифметическое между верхним и нижним уровнем.

Для выбранных факторов (табл. 1) были определены «звёздные» точки – два уровня варьирования каждым из трёх факторов, значения которых лежат за пределами плана, соответствующего полиному второго порядка для трёх независимых переменных [6]. Результаты расчётов параметров «звёздных» точек показаны в табл. 2.

Проведение опытов в «звёздных» точках необходимо для дальнейшей проверки адекватности выбранной модели эксперимента по критерию Фишера. Табличное

значение критерия Фишера для ортогонального центрально-композиционного плана второго порядка для трёхфакторного процесса определено как $F = 19,4$. После определения «звёздных» точек рассчитывали матрицу эксперимента, при этом каждый из опытов проводили в трёхкратной повторности для получения достоверных данных.

Далее проводили проверку значимости коэффициентов регрессии по факторной обработке по критерию Стьюдента. Степень свободы для данного эксперимента – 3, надёжность – 90%, следовательно, значение коэффициента Стьюдента $t = 1,78$. После определения значимых коэффициентов составляли уравнение регрессии, закодированные значения варьируемых факторов x_1, x_2, x_3 показаны в табл. 2. Для определения полей отклика и степени влияния этих факторов на результирующую функцию в уравнении регрессии раскрывали значения каждого из них по формуле [6]:

$$x_i = (x_i^* - x_{i0}^*) / I_0, \quad (1)$$

где x_i – закодированное значение фактора (-1,0,1),

x_i^* – натуральное значение фактора,
 x_{i0}^* – натуральное значение основного уровня фактора,
 I_0 – интервал варьирования.

После получения уравнения регрессии составляли уравнения функций отклика при фиксированных значениях варьируемых факторов, которые определяли согласно методике [6].

Матрица эксперимента, проверка адекватности выбранной модели по критерию Фишера, проверка значимости коэффициентов регрессии по факторной обработке, уравнение регрессии, функции поверхностей отклика и графики для них представлены в табл. 3. Значения столбца y_0 представляют собой значения результирующей функции, то есть концентрации клеток дрожжей через сутки от начала культивирования при подсчёте в камере Горяева. Также проводили подсчёт клеток в пробах из контрольных образцов. Концентрация клеток в контрольных образцах в среднем составила $8,54 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, что меньше значений результирующей функции y_0 для многофакторного процесса (табл. 3).

Таблица 2

Параметры «звёздных» точек

Фактор	«Звёздная» точка – 1,2154	«Звёздная» точка –1,2154
Температура нагрева, °С	$1,2154 \cdot 40 = 48,616$	$30 - (0,2154 \cdot 30) = 23,538$
Мощность работы магнетрона, Вт	$1,2154 \cdot 900 = 1093,9$	$300 - (0,2154 \cdot 300) = 235,38$
Время обработки, с	$1,2154 \cdot 8 = 9,7232$	$4 - (0,2154 \cdot 4) = 3,1384$

Таблица 3

Матрица ортогонального центрально-композиционного плана второго порядка для трёхфакторного процесса

№ опыта	Температура нагрева, °С	Мощность работы магнетрона, Вт	Время обработки, с	x_1	x_2	x_3	y_0 Концентрация клеток, (10^6) КОЕ/мл
1	40	900	8	1	1	1	8,9
2	30	900	8	-1	1	1	16,5
3	40	300	8	1	-1	1	9,3
4	30	300	8	-1	-1	1	24,7
5	40	900	4	1	1	-1	10,4
6	30	900	4	-1	1	-1	11,9
7	40	300	4	1	-1	-1	12,5
8	30	300	4	-1	-1	-1	16,8
9	48,616	600	6	1,2154	0	0	9,6
10	23,538	600	6	-1,2154	0	0	35,7
11	35	1093,86	6	0	1,2154	0	16,4
12	35	235,38	6	0	-1,2154	0	20,2
13	35	600	9,7232	0	0	1,2154	15,2
14	35	600	3,1384	0	0	-1,2154	24,7
15	35	600	6	0	0	0	31,95

Далее необходимо удостовериться в том, что выбранная модель проведения многофакторного эксперимента была адекватна. Для этого проводили расчет значения критерия Фишера, который в среднем составил $F = 13,534$. Значит, уравнение регрессии, которое будет получено на основе рассчитанных данных, будет адекватно описывать процесс в пределах исследуемой области. Далее проводили расчёт критериев Стьюдента для каждого коэффициента регрессии, затем сравнивали их значения со значением табличного критерия Стьюдента для установления его значимости и, возможно, его участия в уравнении регрессии. В результате было получено уравнение регрессии для данного эксперимента в закодированном виде:

$$y_0 = 17,556 - 5,525 \cdot x_1 - 1,842 \cdot x_2 - 2,150 \cdot x_1 \cdot x_3 - 3,301 \cdot x_1 \cdot x_1 - 6,235 \cdot x_2 \cdot x_2 - 5,128 \cdot x_3 \cdot x_3 \quad (2)$$

Уравнение регрессии в раскодированном виде:

$$a(x,y,z) = 17,556 - 5,525 \cdot (0,2 \cdot x - 7) - 1,842 \cdot (0,003 \cdot y - 2) - 2,15 \cdot (0,2 \cdot x - 7) \cdot (0,5 \cdot z - 3) - 3,301 \cdot (0,2 \cdot x - 7) \cdot (0,2 \cdot x - 7) - 6,235 \cdot (0,003 \cdot y - 2) \cdot (0,003 \cdot y - 2) - 5,128 \cdot (0,5 \cdot z - 3) \cdot (0,5 \cdot z - 3), \quad (3)$$

где $a(x,y,z) = y_0$ – значения результирующей функции.

После проверки адекватности выбранной модели эксперимента и составления уравнения регрессии определяли уравнения функций отклика при фиксированных значениях варьируемых факторов, а также сами поверхности отклика в виде контурных графиков. В качестве фиксированных значений варьируемых факторов были определены следующие:

$x = 30,6^\circ\text{C}$ – фиксированная температура для уравнения функции и поверхности отклика плотности культуры от мощности и времени работы магнетрона;

$y = 600 \text{ Вт}$ – фиксированная мощность работы магнетрона для уравнения функции и поверхности отклика плотности культуры от температуры нагрева взвеси дрожжей и времени работы магнетрона;

$z = 6 \text{ с}$ – фиксированное время работы магнетрона для уравнения функции и поверхности отклика плотности культуры от температуры нагрева взвеси дрожжей и мощности работы магнетрона.

Следовательно, уравнение функции отклика при $x = 30,6^\circ\text{C}$ будет выглядеть так:

$$a(y,z) = 17,556 - 5,525 \cdot (0,2 \cdot 30,6 - 7) - 1,842 \cdot (0,003 \cdot y - 2) - 2,15 \cdot (0,2 \cdot 30,6 - 7) \cdot (0,5 \cdot z - 3) - 3,301 \cdot (0,2 \cdot 30,6 - 7) \cdot (0,2 \cdot 30,6 - 7) - 6,235 \cdot (0,003 \cdot y - 2) \cdot (0,003 \cdot y - 2) - 5,128 \cdot (0,5 \cdot z - 3) \cdot (0,5 \cdot z - 3). \quad (4)$$

График поверхности отклика для функции отклика, указанной в формуле (4), представлен на рис. 1, где показано, что оптимум воздействия СВЧ-излучения низкой плотности мощности на биомассу клеток дрожжей при фиксированной температуре $30,6^\circ\text{C}$ расположен между значениями 5,2 и 7,6 с по шкале времени и между значениями 420 и 810 по шкале мощности.

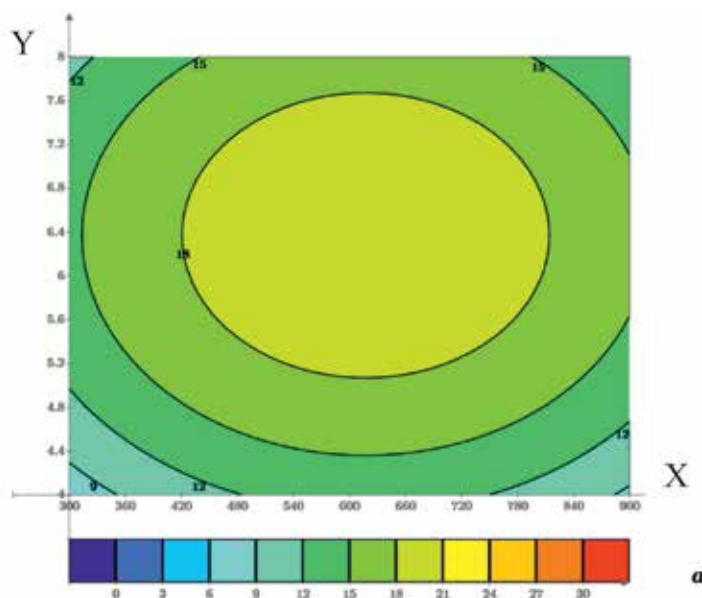


Рис. 1. Поверхность отклика для уравнения функции зависимости плотности культуры от мощности и времени облучения.

Y – длительность работы магнетрона, с; X – значения мощности работы магнетрона, Вт; a – значения результирующей функции для данной поверхности отклика, (10^6) КОЕ/мл

Внутри данного оптимума прирост биомассы клеток дрожжей достигал $18,0 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, что больше прироста биомассы в контроле в 2,1 раза.

Далее определили уравнение функции отклика при $y = 600$ Вт:

$$a(x,z) = 17,556 - 5,525 \cdot (0,2 \cdot x - 7) - 1,842 \cdot (0,003 \cdot 600 - 2) - 2,15 \cdot (0,2 \cdot x - 7) \cdot (0,5 \cdot z - 3) - \\ - 3,301 \cdot (0,2 \cdot x - 7) \cdot (0,2 \cdot x - 7) - 6,235 \cdot (0,003 \cdot 600 - 2) \cdot (0,003 \cdot 600 - 2) - 5,128 \cdot (0,5 \cdot z - 3) \cdot (0,5 \cdot z - 3). \quad (5)$$

График поверхности отклика для функции отклика, указанной в формуле (5), представлен на рис. 2, где показано, что зона оптимума воздействия факторов так же, как и на рис. 1, имеет вид замкнутой окружности и ограничена значениями 5,2 и 7,6 с по шкале времени и 26,5 и 35,0°C по шкале температуры.

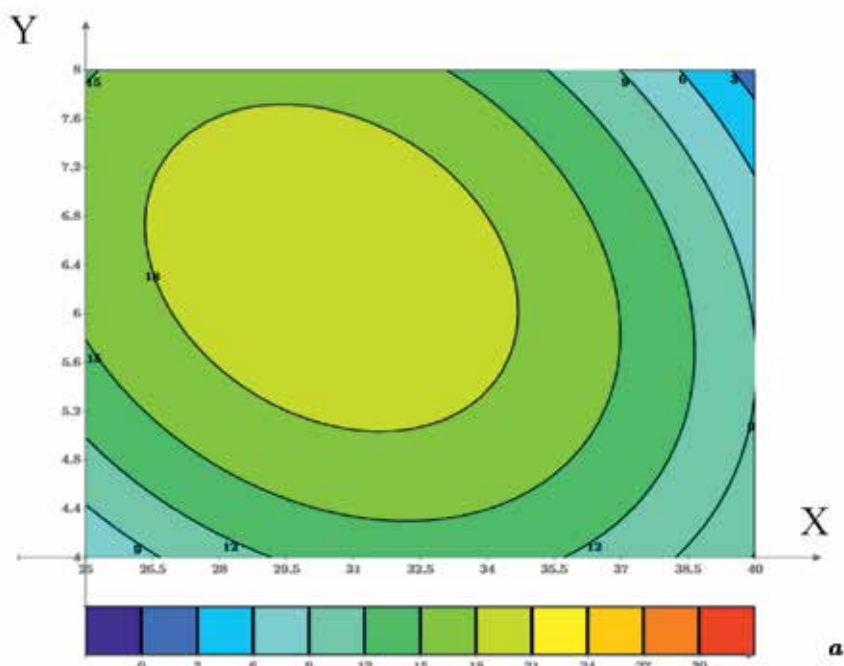


Рис. 2. Поверхность отклика для уравнения функции зависимости плотности культуры от температуры нагрева взвеси дрожжей и времени обработки.
 Y – длительность работы магнетрона, с; X – значения температуры нагрева взвеси дрожжей, °С;
 a – значения результирующей функции для данной поверхности отклика, ($\cdot 10^6$) КОЕ/мл

Внутри данного оптимума так же, как и в случае с графиком на рис. 1, прирост биомассы может достигать $18,0 \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

После этого определили уравнение функции отклика при $z = 6$ с:

$$a(x,y) = 17,556 - 5,525 \cdot (0,2 \cdot x - 7) - 1,842 \cdot (0,003 \cdot y - 2) - 2,15 \cdot (0,2 \cdot x - 7) \cdot (0,5 \cdot 6 - 3) - \\ - 3,301 \cdot (0,2 \cdot x - 7) \cdot (0,2 \cdot x - 7) - 6,235 \cdot (0,003 \cdot y - 2) \cdot (0,003 \cdot y - 2) - 5,128 \cdot (0,5 \cdot 6 - 3) \cdot (0,5 \cdot 6 - 3). \quad (6)$$

График поверхности отклика для функции отклика, указанной в формуле (6), представлен на рис. 3, из которого видно, что зона оптимума воздействия факторов представляет собой окружность, внутри которой прирост биомассы по расчётам может достигать $18,0 \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

При этом в центре этой зоны оптимума расположена точка, соответствующая приросту биомассы $20,0 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. По оси значений мощности работы магнетрона зона оптимума ограничена величинами 420 и 780 Вт, а по оси значений температур нагрева величинами 27,3 и 36,3°C (рис. 3).

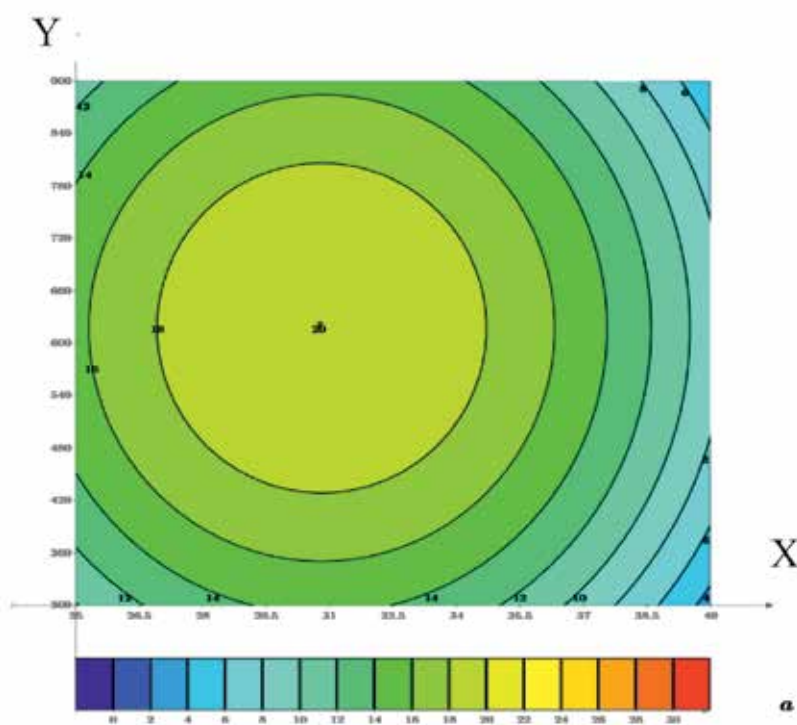


Рис. 3. Поверхность отклика для уравнения функции зависимости плотности культуры от температуры нагрева взвеси дрожжей и мощности работы магнетрона. Y – значения мощности работы магнетрона, Вт; X – значения температуры нагрева взвеси дрожжей, °С; а – значения результирующей функции для данной поверхности отклика, ($\cdot 10^6$) КОЕ/мл

Заключение

Применение многофакторного эксперимента позволило установить оптимальные параметры воздействия СВЧ-излучения низкой плотности мощности на активацию роста клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: мощность работы магнетрона от 420 до 780 Вт, температура нагрева взвеси дрожжей от 26,5 до 36,3°С, время работы магнетрона от 5,2 до 7,6 с. При воздействии СВЧ-излучения в данных диапазонах достигнуто увеличение концентрации клеток дрожжей в 2,1 раз по сравнению с контрольным образцом. С учётом особенностей работы установки для СВЧ-обработки и для проведения дальнейших экспериментов по изучению воздействия СВЧ-излучения низкой плотности мощности в пределах зоны оптимума на клетки дрожжей *Sac. cerevisiae* и *Rh. rubra* были выбраны следующие оптимальные параметры работы установки: мощность излучения 600 Вт, температура разогрева взвеси дрожжей от 26,0 до 35,0°С, время обработки от 5 до 8 с. Полученные результаты могут быть учтены при обработке микроорганизмов-продуцентов в фармацевтических и биотехнологических производствах

для усиления их активности и получения больших выходов целевых продуктов.

Список литературы

1. Шарипова А.Р. Асептика в биотехнологии // Science Time. 2015. № 12 (24). С. 858–861.
2. Рогов И.А., Чоманов У.Ч., Данильчук Т.Н. Эффективность метода обработки быстрыми электронами для снижения порчи пищевого сырья и продовольственных товаров при хранении и транспортировке // Health, Food & Biotechnology. 2020. № 1. С. 84–97.
3. Королев А.А., Тюрина С.Б., Тришканева М.В. Анализ применения микроволнового излучения в технологиях стерилизации растительного сырья // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2019. № 3. С. 81–91.
4. Сигарева Л.П., Ананьева Е.П., Ожигова М.Г., Иванов В.А., Миронов Д.В. Действие СВЧ-излучения на микроорганизмы-контаминанты лекарственного растительного сырья // Фармация. Научно-практический журнал. 2016. № 6 (65). С. 49–52.
5. Sigareva L.P., Ananyeva E.P., Ivanov V.A. The research of short microwave radiation on biochemical activity of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture. International journal of scientific research. 2017. № 6 (4). P. 624–625.
6. Стенина Е.И. Методы и средства научных исследований. Многофакторный эксперимент: методическое пособие. Екатеринбург: УГЛУ, 2013. 47 с.
7. Sartorius Stedim CERTOMAT® CTplus Specifications. [Electronic resource]. URL: <https://manualzz.com/doc/27881570/certomat-%C2%AE-ctplus>. (date of access: 12.01.2022).
8. Кузнецова Т.А., Иванченко О.Б. Морфометрическое исследование клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как метод оценки их физиологического состояния // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2020. № 1 (43). С. 39–46.