

СТАТЬИ

УДК 57.033

**ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ОБРАБОТКИ СВЧ-ИЗЛУЧЕНИЯ
НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ**

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

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

Исследование посвящено изучению воздействия СВЧ-излучения на микроорганизмы и является продолжением исследования по проведению многофакторного эксперимента изучения влияния режимов СВЧ-излучения на дрожжевые грибы, при проведении которого были отмечены области увеличения активности исследованных штаммов. В микробиологической практике СВЧ-обработка применяется как один из методов ингибирующего воздействия на микроорганизмы, однако может иметь и обратный эффект. Актуальность исследования продиктована необходимостью поиска внешних воздействий и их параметров для увеличения выхода клеток важных объектов биотехнологии и синтезируемых ими продуктов. В результате исследования подтвержден диапазон воздействия СВЧ-излучения при мощности работы магнетрона 600 Вт, при 6–7 с при температуре 29,3–30,1 °С, оказывающий положительный эффект усиления роста, значительного увеличения биомассы дрожжей, численности клеток и усиления биохимической активности дрожжей-продуцентов *Saccharomyces cerevisiae* и *Rhodotorula rubra*. При этом пигментирующие клетки дрожжей *Rh. rubra* отвечают на воздействие увеличением концентрации пигментов каротиноидов. Полученные результаты могут быть положены в основу стимулирования штаммов-продуцентов биологически активных веществ *Saccharomyces cerevisiae* и *Rhodotorula rubra* при подготовке их к промышленному применению.

Ключевые слова: дрожжевые грибы, активация роста и биохимической активности, диапазон СВЧ-излучения

**THE EFFECT OF MICROWAVE RADIATION TREATMENT MODES
ON THE CHARACTERISTICS OF YEAST ORGANISMS**

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

Saint Petersburg University of Chemistry and Pharmacy, Saint Petersburg, e-mail: bogdiolg@yandex.ru

The study is devoted to the study of the effects of microwave radiation on microorganisms and is a continuation of the study of a multifactorial experiment to study the effect of microwave radiation modes on yeast fungi, during which areas of increased activity of the studied strains were noted. In microbiological practice, microwave treatment is used as one of the methods of inhibitory effects on microorganisms, but it can also have the opposite effect. The relevance of the study is dictated by the need to search for external influences and their parameters to increase the yield of cells of important objects of biotechnology and the products synthesized by them. The study confirmed the range of exposure to microwave radiation at a magnetron power of 600 W, at 6–7 s at a temperature of 29,3–30,1 °C, which has a positive effect of enhancing growth, a significant increase in yeast biomass, cell numbers and enhancing the biochemical activity of yeast producers *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula rubra*. At the same time, pigmented yeast cells *Rh. rubra* respond to exposure by increasing the concentration of carotenoid pigments. The results obtained can be used as a basis for stimulating strains producing biologically active substances *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula rubra* in their preparation for industrial use.

Keywords: yeast fungi, activation of growth and biochemical activity, microwave radiation range

Актуальность исследования продиктована необходимостью поиска внешних воздействий и их параметров для увеличения выхода клеток важных объектов биотехнологии и синтезируемых ими продуктов. Дрожжевые аскомицеты *Saccharomyces cerevisiae* являются широко используемым модельным организмом в генетических, иммунобиологических и биотехнологических исследованиях [1], и быстрое получение их культур является важным этапом в практике. Выделенные когда-то из водной среды дрожжевые базидиомицеты *Rhodotorula rubra* также представляют собой важный продуцент каротиноидов [2] и экзополисахаридов, имеющих фармакологическую ценность [3].

В микробиологической практике СВЧ-обработка применяется как один из методов ингибирующего воздействия на микроорганизмы. Однако при проведении многофакторного эксперимента [4] были обнаружены параметры воздействия СВЧ-излучения низкой мощности, активирующие рост дрожжей *Sac. cerevisiae* и *Rh. rubra*. Были получены следующие параметры работы установки, при которых наблюдалась активация роста дрожжей: мощность излучения 600 Вт, температура разогрева взвеси дрожжей от 26,0 до 35,0 °С, время обработки от 5 до 8 с. Результаты многофакторного эксперимента были положены в основу настоящих исследований по определению оптимальных режимов

СВЧ-обработки с целью повышения активности штаммов-продуцентов.

Цель работы – изучить воздействие выбранных режимов СВЧ-обработки на рост и активность штаммов-продуцентов биотехнологических производств *Sac. cerevisiae* и *R. rubra*.

Материалы и методы исследования

Для обработки СВЧ-излучением низкой плотности мощности использовали культуры дрожжей *Sac. cerevisiae* ВКМ Y-378 и *Rh. rubra* ВКМ Y-341. Готовили взвеси дрожжей *Sac. cerevisiae* и *Rh. rubra* в физиологическом растворе массой $5,00 \pm 0,01$ г каждая в стеклянных пробирках. Перед обработкой определяли начальную температуру каждой пробирки с культурами ($22,1 \pm 0,1$ °C). Для культивирования обработанных и контрольных 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 $23,0 \pm 0,1$ °C в биореакторе Sartorius Stedim CERTOMAT® STplus [5]. Для определения концентрации клеток в приготовленных взвесах культур и в культуральной жидкости при выращивании обработанных и контрольных образцов дрожжей, использовали метод прямого подсчёта клеток в счётной камере Горяева [6].

Концентрация взвеси дрожжей для обработки составила $6,7 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Увеличение биомассы фиксировали через 24 ч от начала культивирования. Определение концентрации биомассы дрожжей проводили через 48 ч от начала культивирования. Биохимическую активность клеток изучали при помощи теста силы подкисления. Данный тест косвенно указывает на скорость биохимических реакций

в клетках по скорости снижения pH в растворе глюкозы.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты изменения количества клеток дрожжей после обработки представили в табл. 1.

Установлено, что значительный прирост биомассы дрожжей наблюдался для всех опытов внутри оптимального диапазона по сравнению с контрольным образцом. При этом максимальное увеличение биомассы наблюдали в опыте № 2. Концентрация клеток в нём возросла до $24,3 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, что в 2,7 раза больше, чем в контроле. Помимо указанных выше данных значительное увеличение количества клеток в культуральной жидкости наглядно продемонстрировано при микроскопии дрожжей (рис. 1). Данное наблюдение указывает на то, что СВЧ-излучение низкой мощности способно оказывать активизирующее влияние на скорость деления клеток. При подсчёте живых клеток определили, что наибольший процент их содержится в образцах № 1 и 2, что указывает на значимость влияния факторов времени и температуры воздействия на метаболизм исследуемых дрожжей.

Результаты определения биохимической активности клеток дрожжей представлены на рис. 2.

Снижение величины pH растворов происходит быстрее в опытах № 1 и 2, что указывает на большую биохимическую активность дрожжей при данных условиях обработки в сравнении с контролем. Следует отметить снижение метаболической активности культуры в опытах № 3 и 4.

На вторые сутки культивирования определяли количество биомассы дрожжей весовым методом после отделения клеток при помощи центрифугирования и высушивания их на воздухе (рис. 3).

Таблица 1

Параметры обработки и концентрация клеток дрожжей *Sac. cerevisiae*

Режим обработки	Температура нагрева, °C	Мощность работы магнетрона, Вт	Время обработки, с	Концентрация клеток		
				КОЕ·10 ⁶ /мл	Живые клетки, %	Мёртвые клетки, %
Контроль*	22,1±0,1	–	–	8,7	70,2	29,8
1	27,1±0,1	600	5	15,8	80,3	19,7
2	29,2±0,1		6	24,3	80,4	19,6
3	31,0±0,1		7	18,2	74,3	25,7
4	34,3±0,1		8	14,2	65,2	34,8

* – необработанный образец

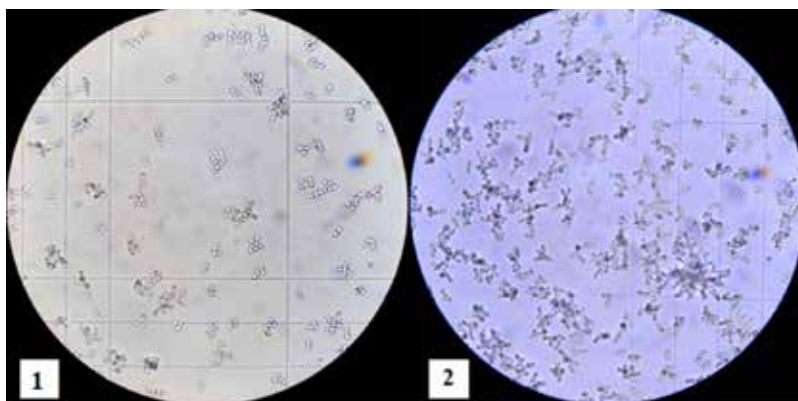


Рис. 1. Количество клеток дрожжей *Sac. cerevisiae*:
1 – контрольный образец, 2 – образец, обработанный в опыте № 2

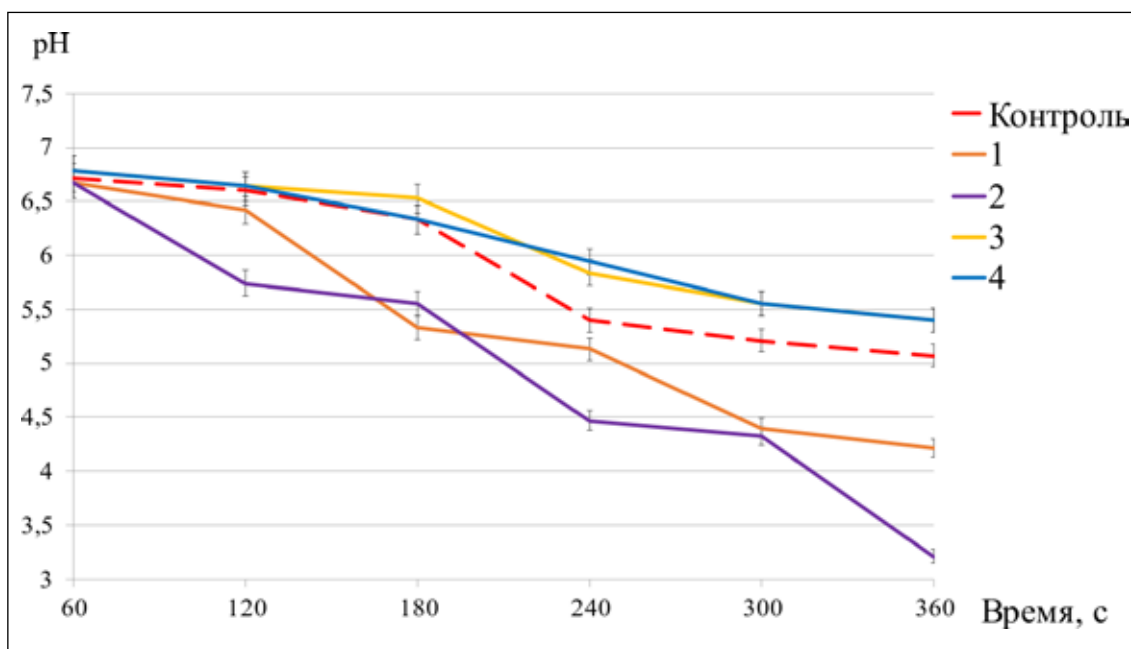


Рис. 2. Интенсивность снижения pH раствора глюкозы: 1–4 – номера опытов

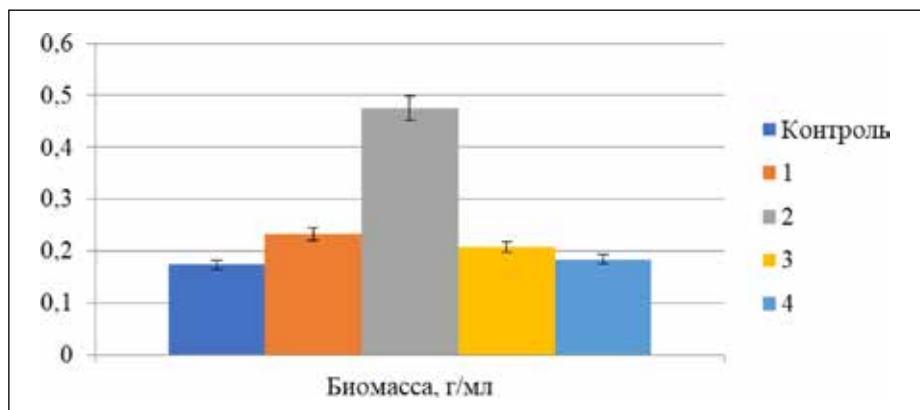


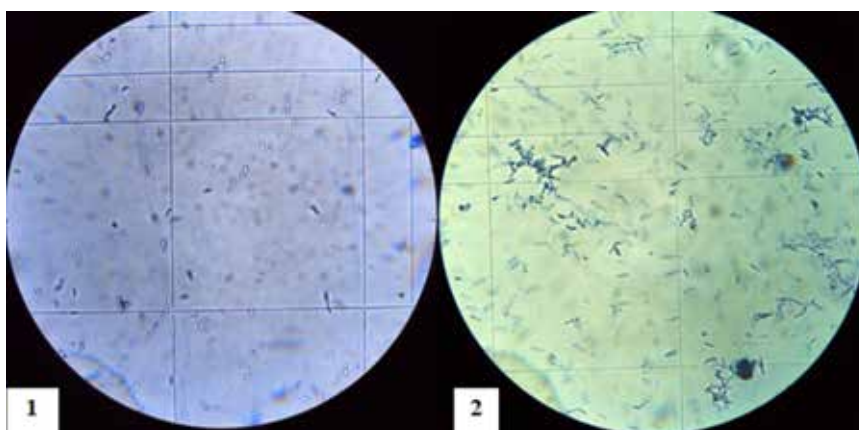
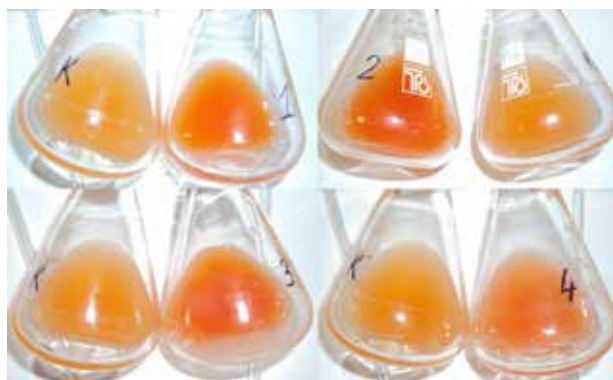
Рис. 3. Количество биомассы дрожжей *Sac. cerevisiae*

Таблица 2

Оптимальные параметры СВЧ-обработки культуры *Rh. rubra*

Режим обработки	Температура нагрева, °С	Мощность работы магнетрона, Вт	Время обработки, с	Концентрация клеток		
				КОЕ·10 ⁶ /мл	Живые клетки, %	Мёртвые клетки, %
Контроль*	22,1±0,1	–	–	6,2	68,1	31,9
1	26,0±0,1	600	5	17,1	77,2	22,8
2	29,3±0,1		6	23,0	78,7	21,3
3	30,1±0,1		7	21,0	70,1	29,9
4	35,4±0,1		8	17,4	64,7	35,3

* – необработанный образец

Рис. 4. Количество клеток дрожжей *Rh. rubra*
1 – контрольный образец, 2 – образец, обработанный в опыте № 2Рис. 5. Изменение пигментации дрожжей *Rh. rubra*
к – контроль, 1–4 – образцы, обработанные в опытах № 1–4 соответственно

Наибольшее количество биомассы образовывалось при температуре облучения 29,2±0,1°С и времени 6 с, что было больше, чем в контроле, в 2,8 раз, тем самым подтверждая ранее полученные результаты (рис. 2).

Результаты воздействия СВЧ-излучения низкой мощности на пигментированные дрожжи *Rh. rubra* представлены в табл. 2.

Значительное увеличение биомассы дрожжей наблюдали во всех обработанных образцах по сравнению с контролем.

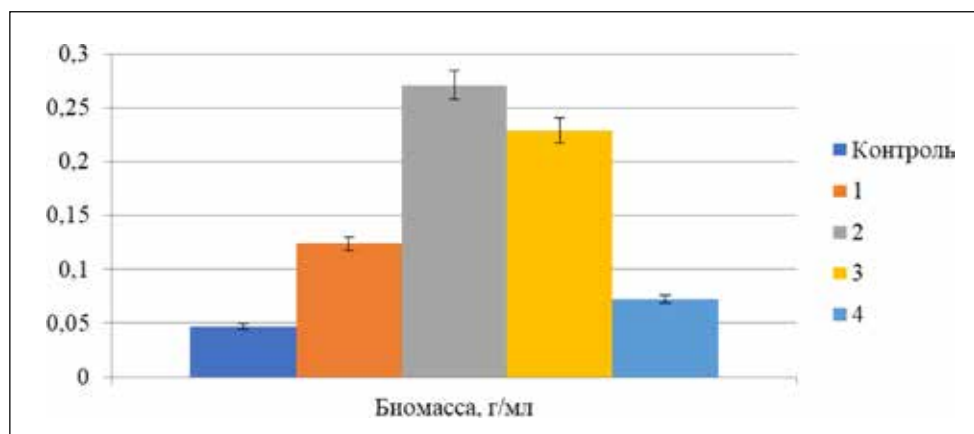


Рис. 6. Количество биомассы дрожжей *Rh. rubra*

При этом максимальный прирост биомассы наблюдали при температурах $29,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$ и $30,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$, концентрация клеток в которых возросла в 3,7 и в 3,4 раз по сравнению с необработанным образцом. Также увеличение количества клеток продемонстрировано на рис. 4 при микроскопии.

При подсчёте живых клеток установили, что наибольший процент их содержится в образцах, обработанных при температурах $26,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ и $29,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (образцы № 1 и 2).

Также после обработки СВЧ-излучением в оптимальном диапазоне отметили усиление пигментации всех обработанных культур в сравнении с контролем, что косвенно указывает на увеличение биохимической активности клеток (рис. 5), что, вероятно, связано с откликом дрожжей *Rh. rubra* на воздействие излучения защитной реакцией увеличения синтеза пигментов-каротиноидов.

Выход биомассы дрожжей *Rh. rubra* определяли на вторые сутки культивирования (рис. 6).

Показано, что наибольший прирост биомассы соответствовал культурам, обработанным в диапазонах от $29,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (6 с) до $30,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (7 с). Концентрация биомассы в этих образцах оказалась выше в 5,7 и в 4,8 раз по сравнению с контролем.

Заключение

На основе анализа полученных результатов показано, что СВЧ-излучение низкой мощности оказывает стимулирующее действие на клетки дрожжей *Rhodotorula rubra* и *Saccharomyces cerevisiae* в определённых диапазонах обработки, а именно: мощность излучения 600 Вт, температура нагрева от $26,0$ до $35,0^\circ\text{C}$, время

обработки от 5 до 8 с. При этом диапазон усиления активности для исследуемых объектов не различался. Для обоих видов дрожжей стимулирующее воздействие СВЧ-излучения подтверждено в диапазоне мощности работы магнетрона 600 Вт, при 6–7 с при температуре не выше $30,1^\circ\text{C}$. Показано, что данные параметры обработки приводят к максимальному увеличению количества живых клеток дрожжей и их биохимической активности, что может быть использовано в перспективе для стимулирования промышленных штаммов-продуцентов БАВ *Saccharomyces cerevisiae* и *Rhodotorula rubra*.

Список литературы

1. Серб Е.М., Соколова Е.Н., Фурсова Н.А., Волкова Г.С., Борщева Ю.А., Курбатова Е.И., Куксова Е.В. Получение биологически активных добавок на основе обогащенной дрожжевой биомассы // Хранение и переработка сельхозсырья. 2018. № 2. С. 74–79.
2. Червякова О.П., Караулова С.С. Исследование каротиногенеза дрожжами *Rhodotorula rubra* // Успехи в химии и химической технологии. 2009. № 10 (103). С. 117–120.
3. Савчук А.В., Новик Г.И. Каротиноид синтезирующие дрожжевые грибы и их применение в биотехнологии (обзор литературы) // Пищевая промышленность: наука и технологии. 2020. Т. 13. № 3 (49). С. 70–83.
4. Ананьева Е.П., Богданова О.Ю., Гурина С.В. Многофакторный эксперимент в определении оптимальных диапазонов СВЧ-излучения, активизирующих рост дрожжей // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2022. № 1. С. 12–17.
5. Sartorius Stedim CERTOMAT® CTplus Specifications. [Электронный ресурс]. URL: <https://manualzz.com/doc/27881570/certomat-%C2%AE-ctplus> (дата обращения: 12.01.2022).
6. 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.