

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2020 560**
(22) Paraiškos padavimo data: **2020-12-03**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2022-06-10**

(71) Pareiškėjas:
Vytauto Didžiojo universitetas, K. Donelaičio g. 58, 44248 Kaunas, LT
(72) Išradėjas:
Rasa ŽUKIENĖ, LT
Vida MILDAŽIENĖ, LT
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Gediminas PRANEVIČIUS, 54, Advokatų profesinė bendrija IP FORMA, Užupio g. 30, LT-01203 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Steviolio glikozidų kiekio saldžiojoje stevijoje padidavimo būdas, taikant stevijos sėklų apdorojimą šalta plazma prieš sėją

(57) Referatas:

Išradimas skirtas steviolio glikozidų kiekio saldžiosios stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) augaluose padidavimo būdui, taikant stevijos sėklų apdorojimą kondensatoriaus tipo iškrovos šalta plazma prieš sėją. Sėklos supilamos vienu sluoksniu į sterilią stiklinę 10 cm skersmens Petri lėkštelę, kuri patalpinama tarp dviejų lygiagrečių vėsiamų 120 mm diametro varinių elektrodų, įmontuotų hermetiškoje nerūdijančio plieno 0,053 m³ tūrio vakuuminėje kameroje, ant apatinio elektrodo. Kameroje sukuriamas 100-200 Pa vakuumas. Darbinės dujos – likutinis oras. Atstumas tarp sėklų ir viršutinio plazmos elektrodo – 1,7 cm. Sėklos apdorojamos 0,5-7 min. 0,6-0,7 W/cm² galios tankio iškrova. Apdorotos sėklos laikomos 20-25°C temperatūroje tamsoje 6 dienas, po to pasėjamos ir augalai auginami įprastomis sąlygomis. Panaudojant šiame išradime aprašomą technologiją – trumpalaikį stevijos sėklų apdorojimą kondensatoriaus tipo iškrovos šalta plazma, galima ženkliai – nuo 1,5 iki 7 kartų – padidinti atskirų steviolio glikozidų ir bendrą jų kiekį augale, net ir veislėse, pasižyminčiose dideliu steviolio glikozidų kiekiu.

STEVIOLIO GLIKOZIDŲ KIEKIO SALDŽIOJOJE STEVIJOJE PADIDINIMO BŪDAS, TAIKANT STEVIJOS SĖKLŲ APDOROJIMĄ ŠALTA PLAZMA PRIEŠ SĖJĄ

TECHNIKOS SRITIS

Išradimas skirtas steviolio glikozidų kiekio padidinimui saldžiosios stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) augaluose, taikant sėklų apdorojimą šalta plazma prieš sėją.

TECHNIKOS LYGIS

Steviozidas (Stev) ir rebaudiozidas A (RebA) yra pagrindiniai steviolio glikozidai, randami saldžiosios stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) lapuose. Šie junginiai yra kelis šimtus kartų saldesni už cukrų, todėl naudojami kaip natūralūs saldikliai, kurių ilgalaikis vartojimas nesukelia neigiamo poveikio žmogaus organizmui, o turi keletą teigiamų poveikių: mažina cukraus, radionuklidų ir cholesterolio kiekį kraujyje, pagerina ląstelių atsistatymą, padidina kraujo krešėjimą, sumažina neoplastinį augimą ir sustiprina kraujagysles.

Augant šių produktų paklausai, yra siekiama, kad stevijos augalai būtų lengviau dauginami ir užaugintų daugiau biomasės, kurioje būtų maksimalus kiekis Stev ir RebA, todėl paprasti ir nedarantys būdai sėklų daigumui ir tolimesnei tikslinių metabolitų biosintzei aktyvinti būtų ekonomiškai naudingi.

Ukrainos patente Nr. UA97958 aprašytas stevijos sėklų daigumo stimuliavimo būdas, apimantis sėklų mirkymą mikroelementų druskų tirpale, besiskiriantis tuo, kad naudoja tokią mikroelementų sudėtį: 0,03% cinko (0,5–0,8 l/1 kg sėklų) + kobalto 0,03% (0,5–0,8 l/1 kg sėklų) + 0,01% boro (0,4–0,6 l/1 kg sėklų) + vandens 2 l/1 kg. Tokiu būdu padidinama sėklų daigumo energija.

Praktikoje dabartiniu metu yra taikomi šie būdai steviolio glikozidų biosintezės didinimui saldžiosios stevijos augaluose:

- selekcija;
- ląstelių kultūrų taikymas stevijos dauginimui;
- auginimo sąlygų parinkimas (dienos ilgumas, drėgmė, temperatūra);
- tręšimas, įskaitant mikroorganizmų naudojimą;

- poveikis nanodalelėmis.
- steviozido vertimas rebaudiozidu rekombinantiniais fermentais.

Pagrindiniai šių metodų trūkumai yra, kad neretai jie reikalauja daug laiko, yra brangūs arba taršūs, o auginimo sąlygos, priklausančios nuo klimato, nėra lengvai modifikuojamos. Stevijos dauginimas taip pat yra problematiškas: sėklų daigumas yra menkas (15-50 %), o vegetatyvinis dauginimas iš vieno individo duoda mažesnę derlių.

Panaudojant šiame išradime aprašomą technologiją – trumpalaikį (0,5-7 min) stevijos sėklų apdorojimą kondensatoriaus tipo iškrovos šalta plazma, esant 0,6-0,7 W/cm² galios tankio iškrovai, galima ženkliai – nuo 1,5 iki 7 kartų – padidinti atskirų steviolio glikozidų ir bendrą jų kiekį augale, net ir veislėse, pasižyminčiose dideliu steviolio glikozidų kiekiu.

IŠRADIMO ESMĖ

Šio išradimo tikslas – pasiūlyti naują netaršų metodą paskatinti steviolio glikozidų biosintezę saldžiojoje stevijoje, prieš sėją jos sėklas trumpą laiką (0,5-7 min) apdorojant kondensatoriaus tipo iškrovos šalta plazma, esant 0,6-0,7 W/cm² galios tankio iškrovai. Panaudojant šiame išradime aprašomą technologiją galima ženkliai – nuo 1,5 iki 7 kartų – padidinti atskirų steviolio glikozidų ir bendrą jų kiekį augale, net ir veislėse, pasižyminčiose dideliu steviolio glikozidų kiekiu. Sutrumpinus ar pailginus poveikio laiką, palyginus su siūlomu 0,5-7 min apdorojimu, ir padidinus ar sumažinus iškrovos galios tankį, palyginus su siūlomu 0,6-0,7 W/cm², padidinti atskirų steviolio glikozidų ir bendrą jų kiekį augale nepavyksta.

BRĖŽINIŲ PAVEIKSLŲ APRAŠYMAS

1 pav. pateikti steviolio glikozidų rebaudiozido A (RebA), steviozido (Stev) kiekio ir bendro jų kiekio (RebA + Stev) pokyčiai saldžiosios stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) augaluose, po skirtingos trukmės sėklų veikimo šalta plazma.

IŠRADIMO REALIZAVIMO APRAŠYMAS

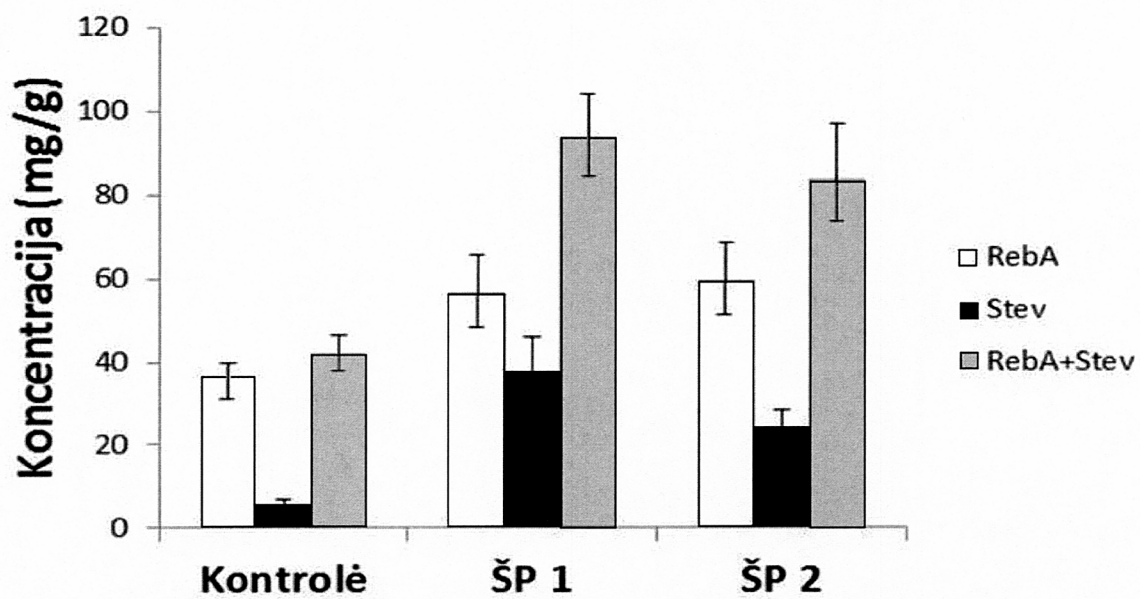
Detalus proceso eigos aprašas:

1. Saldžiosios stevijos sėklos supilamos vienu sluoksniu į sterilią stiklinę 10 cm skersmens Petri lėkštelę, kuri patalpinama tarp dviejų lygiagrečių vėsinaamų 120 mm skersmens varinių elektrodų, įmontuotų hermetiškoje nerūdijančio plieno 0,053 m³ tūrio kameroje, ant apatinio elektrodo;
2. Atstumas tarp sėklų ir viršutinio elektrodo – 1,7 cm;
3. Kameroje sukuriamas 100-200 Pa vakuumas. Darbinės dujos – likutinis oras. Sėklos apdorojamos 0,5-7 min 0,6-0,7 W/cm² galios tankio iškrova;
4. Kamera atidaroma, sėklos išimamos, supilamos į polietileno maišelį ir laikomos 20-25°C temperatūroje tamsoje 6 dienas;
5. Praėjus šiam laikotarpiui, sėklos pasėjamos ir augalai auginami įprastomis sąlygomis;
6. Po 14 savaičių auginimo augalai nupjaunami ir tiriamas juose susikaupusių steviolio glikozidų kiekis efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

1 pav. pateikti steviolio glikozidų rebaudiozido A (RebA), steviozido (Stev) kiekio ir bendro jų kiekio (RebA + Stev) pokyčiai saldžiosios stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) augaluose, po skirtingos trukmės sėklų veikimo šalta plazma (ŠP1 – 5 min., ŠP2 – 7 min.), lyginant su kontrole (sėklos neveiktos šalta plazma) (metodas – efektyvioji skysčių chromatografija, n = 3, vidurkis ± standartinė paklaida). Po poveikio šalta plazma gauti kiekių skirtumai yra statistiškai patikimi pagal Stjudento t-testą, p < 0,05).

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Steviolio glikozidų kiekio saldžiosios stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) augaluose padidavimo būdas, apimantis stevijos sėklų apdorojimą prieš sėją, siekiant padidinti jų daigumą ir paskesnę tikslinių metabolitų biosintezę, besiskiriantis tuo, kad stevijos sėklos apdorojamos kondensatoriaus tipo iškrovos šalta plazma, taikant šiuos etapus ir parametrus:
 - (a) stevijos sėklos talpinamos į vakuuminę kamerą, esant darbiniam slėgiui 100-200 Pa, kur darbinės dujos – likutinis oras, ir įjungiama kondensatoriaus tipo šalta plazma,
 - (b) sėklos apdorojamos 0,5-7 min 0,6-0,7 W/cm² galios tankio iškrova, esant 1,7 cm atstumui tarp sėklų ir viršutinio plazmos elektrodo,
 - (c) po modifikavimo, sėklos išimamos iš vakuuminės kameros į atmosferos aplinką, supilamos į polietileno maišelį ir laikomos 20-25°C temperatūroje tamsoje 6 dienas; praėjus šiam laikotarpiui, sėklos pasėjamos ir augalai auginami įprastomis sąlygomis.
2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad stevijos sėklos talpinamos tarp dviejų lygiagrečių vėsinamų 120 mm diametro varinių elektrodų, įmontuotų hermetiškoje nerūdijančio plieno 0,053 m³ tūrio vakuuminėje kameroje, ant apatinio elektrodo, supiltos į sterilią stiklinę 10 cm skersmens Petri lėkštelę.



1 pav.