



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

201 693

(11)

(B1)

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 05 03 79

(21) PV 2922-78

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/14

(40) Zverejnené 31 03 80

(45) Vydané 01 02 83

(75)

Autor vynálezu KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA RNDr. DrSc., HRONSKÁ LÝDIA, BRATISLAVA a
BĚHALOVÁ BOŽENA ing., PRAHA

(54) Kmeň mikroorganizmu *Saccharomyces cerevisiae*

1

Vynález sa týka kmeňa *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-21-e, ktorý produkuje nad 2 % ergosterolu v sušine biomasy.

Kvasinky z rodu *Saccharomyces* sú najdôležitejšími producentmi ergosterolu. Hodnoty, ktoré sa v staršej literatúre uvádzajú, sú pomerne nízke. Proskurjakov, Popova a Ossipov (Biochimia 3:397, 1938) zistili u kŕmneho droždía *Monilia murmanica* 0,31 %, u *Torula utilis* 0,55 % a u pivovarskej rasy Froberg 2,36 % v sušine. Preto pokladajú pivovarské kvasinky za zvlášť bohaté ergosterolom, napr. aj kmeň 776 mal 2,5 %; vinné kvasinky mali len 0,4 až 2,19 % ergosterolu v sušine. Appleton a Kleber (Appl. Microbiol. 3:249, 1955) dokázali u *Candida krusei* 0,3 % u *C. parapsilosis* dokonca len 0,06 %, avšak u *S. cerevisiae* až 9 % celkových sterolov. Mitra a Garg (J. Inst. Brew. 64:327, 1958) stanovili u Dhar-ských kvasiniek 0,1 až 0,5 % ergosterolu v sušine, čo pokladajú za rovnocenné s inými stanoveniami u *Torula utilis*. Viac ako 20 rokov ostal výskum v oblasti vitamínu D v stave relatívneho pokoja, stúpol až v niekoľkých posledných rokoch. Jeliazjan, Marojan a Arumjunian (Mikrobiologia 44:632, 1975) zisťovali obsah celkových sterolov u kvasiniek a potvrdili, že najvyššia produkcia je u sacharomycét, od 1,3 do 3,13 % na sušinu biomasy. Dikanskaja a Ro-byševa (Prikl. Biochim. i Mikrobiol. 11:21, 1975) zisťovali obsah ergosterolů u *Candida*, *Torulopsis* a *Rhodotorula* a zistili, že sa pohybuje medzi 0,4 až 0,6 % na sušinu a len u *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 stanovili 2,4 %. Najnovšie Kosikov, Ljapunová, Rajevskaja a spol. (Mikrobiologia 46:86, 1977) uvádzajú produkciu ergosterolu u kvasiniek takto:

201 893

pekárska kvasinka *Odesskaja 14* produkuje 2,3 %, ostatné pekárske kvasinky od 1,8 do 1,9 %, liehovarské rasy od 2,0 do 2,2 % a pivovarská rasa 4228 okolo 1,5 % ergosterolu v sušine. Z týchto kultúr izolovali monosporické kultúry, haploidné a diploidné a rad hybridov, ktoré produkovali od 1,3 do 2,3 %. Podarilo sa im získať adenín deficitné mutanty, u ktorých bola zvýšená produkcia ergosterolu až do 4,8 % v sušine.

Predmetom vynálezu je kmeň *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-21-e, ktorý produkuje veľké množstvo ergosterolu. Pôvodný kmeň 21-4-21, ktorý tvoril len 10 až 25 % buniek s kvocientom P/O menším ako 1 alebo rovným 1, sa naočkoval v suspenzii 10^8 buniek.ml⁻¹ na povrch sladinového agaru a do stredu misky na povrch agaru sa uložil kryštálik gáfru. Pod vplyvom tohto mutagénu prebehla kultivácia v tme pri 28 °C do doby, keď sa objavili na povrchu ojedinelé kolónie kvasiniek. Opakovaným rozsevom na misky s gáfrom sa vypestoval mutantný kmeň, ktorý vytváral len bunky s koeficientom povrch/objem menším ako 1 (ku koncu exponenciálnej fázy, teda v dobe maximálnej produkcie ergosterolu). Takto vyšľachtený kmeň sa označil ako CCY 21-4-21-e.

Kmeň CCY 21-4-21-e vytvára guľaté, oválne aj pretiahle bunky, ktorých kvocient P/O je menší ako 1. Obrovské kolónie tohto kmeňa sú hladké a prirastajú za 100 hodín asi o 1,7 mm. V tekutom prostredí kmeň rýchlo sedimentuje, na povrchu nevytvára kožku, miazdru ani prstenec.

Kmeň CCY 21-4-21-e ani po indukcii acetátom nesporuluje. K rastu potrebuje v prostredí vitamíny. Pri 5 °C rastie veľmi slabo, pri teplote 42 °C rastie dobre, optimálna teplota rastu je však 28 °C. Kvasí glukózu, galaktózu, maltózu, sacharózu a rafinózu. Tieto cukry tiež asimiluje a okrem toho využíva tiež maltotriózu a maltotetraózu, neasimiluje však dusičnan draselný ani lyzín. Sacharózu rozkladá už behom 3 hodín a glukózu a fruktózu a tieto monosacharidy potom kompletne počas 12 hodín utilizuje. V hroznovom mušle, v pívnej sladine a v melasovom prostredí rastie s rovnakou rýchlosťou. Znáša až 12 % etanolu a 5 % kyseliny siričitej. Je citlivý k aktidiónu už v jeho koncentrácii 0,1 µg. 2 %-ná kyselina mliečna inhibuje rast kultúry na 60 %, 2 %-ná kyselina vínna na 15 %. Extracelulárne polysacharidy dávajú jód-škrobovú reakciu.

Kmeň CCY 21-4-21-e neaglutinuje so sérom, pripraveným proti typickým predstaviteľom *Saccharomyces cerevisiae* alebo len pri najnižšom zriedovacom titre. Aglutinuje so sérom proti *Candida robusta* a *Saccharomyces cartilaginosus* ešte pri titre riedenia 320. *Candida robusta* a *Saccharomyces cartilaginosus* sa dnes počítajú k druhu *Saccharomyces cerevisiae* a pri numerickej klasifikácii sa javia ako okrajové varianty tohto druhu.

Kmeň CCY 21-4-21-e bol pestovaný na pôde Olson-Jensena umelého zloženia a na indukčnej melasovej pôde na trepačke a kontinuálne. Zloženie pôd a výsledky kultivácie vidno z tab.2.

Ergosterol bol stanovený po kultivácii a lyofilizácii alebo priamo s použitím vlhkej biomasy. K stanoveniu sa použila 50 až 100 mg vzorka lyofilizovaných kvasiniek, ktorá sa hydrolyzovala v 40 % hydroxide draselnom po dobu 1 hodiny pri 0,196 MPa, vytrepala dietyléterom po dobu 2 hodín na trepačke pri 4 °C. Po oddelení éterovej vrstvy sa vodná vrstva ešte raz vytrepala éterom a spojené éterové extrakty sa dobre premyli destilovanou vodou.

Čistý éterový extrakt sa odparil do sucha v rotačnej vákuovej odparke. Odparok sa rozpustil v 0,5 ml chloroformu a doplnil etanolom do 10 ml, príp. zriedil zmesou chloroform : éter 5 : 100. Dôkaz ergosterolu sa kontroloval registračným spektrofotometrom a množstvo sa počítalo z hodnôt pri vlnovej dĺžke 282 nm.

Tab. 1 ukazuje závislosť tvorby ergosterolu od genotypu buniek kolónií, ktorý sa overoval prostredníctvom morfolologickej charakteristiky buniek populácie, ako bolo už uvedené. Závislosť tvorby ergosterolu na priemernom kvociente P/O je v určitej oblasti okolo 1 a vyššie priamoúmerná, v oblasti P/O menšom ako 1 sa už neprejavuje priamoúmerne, pretože P/O nebýva spravidla menší ako 0,7. Tu potom pôsobia ešte stimulačne vonkajšie vplyvy. Tak u kmeňa CCY 21-4-21-e bolo zistené mnoho rôznych hodnôt obsahu ergosterolu v kvasinách, ktorých rozpätie bolo od 2,69 do 4,35 (pri priemernom P/O menšom ako 1), ktorých priemer činil 3,64 % ergosterolu v sušine, smerodajná odchýlka 0,52 a koeficient variance 14,32 %.

Tabuľka 2 ukazuje výsledky pokusu s kultiváciou kmeňa CCY 21-4-21-e za rôznych podmienok, t.j. na pôdach rôzneho zloženia pri statickej aj kontinuálnej kultivácii. Z týchto výsledkov vyplýva, že obsah ergosterolu u vyselektovaného kmeňa 21-4-21-e môže dokonca prevýšiť až 6 % v sušine. Pritom prírastky biomasy na melasovej pôde sú uspokojivé.

Tabuľka 3 ukazuje porovnanie vlastností mutanta s divokým kmeňom.

Tabuľka 1

Závislosť produkcie ergosterolu od morfologického charakteru populácie buniek u kmeňa CCY 21-4-21

Číslo populácie	Priemerný kvocient P/O	% ergosterolu v sušine biomasy (priemer 2 až 3 paraleliek)
e/3	1,00	2,69
e/6	1,15	2,24
e/2	1,30	2,23
e/4	1,42	2,15
e/1	1,44	2,12
e/7	1,47	2,10
e/8	1,70	1,85

Tabuľka 2

Produkcia biomasy a ergosterolu za rôznych podmienok kultivácie

Pokus č.	Rast na pôde Olson-Jensen ^X mg sušiny.ml ⁻¹	Indukčná melasová pôda ^{XX} mg sušiny.ml ⁻¹	Produkcia ergosterolu v % na sušinu biomasy			
			na trepačke		kontinuálne	
	po 24 h	po 72 h	po 48 h	po 72 h	po 48 h	po 72 h
1	2,9	8,7	5,9	6,2	5,1	6,2
2	2,6	8,8	-	6,0	-	5,3

^XZloženie pôdy Olson-Jensena: 1,1 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄, 1,5 g asparagín, 0,1 g CaCl₂, 1,5 g citran sodný, 1,0 práškový kvasničný extrakt a 20 g glukózy na 1.000 ml destilovanej vody. Pridáva sa po 1 ml roztokov A, B, S.

- Roztok A: 0,08 g kys. listová, 0,5 g m-inositol, 0,44 g tiamín, 0,15 g kys. nikotinová, 0,05 g Ca-pantotenát, 0,120 g pyridoxín na 100 ml destilovanej vody

- Roztok B: 0,25 g ribovlavín, 0,3 g kys. p-aminobenzoová, 0,05 g biotín na 100 ml dest. vody

- Roztok S: 0,146 ZnSO₄, 0,067 g CuSO₄, 1,18 g Fe(NH₄)₂SO₄ na 100 ml dest. vody.

^{XX}Zloženie indukčnej melasovej pôdy: 102 g melasy, 10 g corn steepu, 0,06 g (NH₄)₂HPO₄, 0,5 g K₂HPO₄ rozpustiť v 0,5 lit. 1 %-ného síranu hlinitého. Mieša sa 20-25 min., neutralizuje NaOH na pH 7, zavarí, sfiltruje a znova upraví pH na 7.

Tabuľka 3

Porovnanie niektorých vlastností mutanta s divkým kmeňom

Vlastnosť	Divý kmeň CCY 21-4-21	Mutant CCY 21-4-21-e
Morfologické parametre na sladine po 3 dňoch, 28 °C:		
Priemery: dĺžok buniek	7,39	14,84
dĺžko-šírkový pomer	1,16	1,18
povrch/objem buniek	1,15	0,70
Flokulačná schopnosť podľa počtu buniek v zhlukoch (priemerný počet)	7	1 až 2
Charakter obrovskej kolónie	mastne lesklá, drsná, okraj laločnatý	mäkká lesklá, okraj rovný
Osmofília (znáša)	40 % sacharózy	28 % sacharózy

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

201 893

Kmeň mikroorganizmu *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-21-e, produkující ergosterol.