



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(21) [PV 896-78]
(22) Prihlášené 13 02 78

(40) Zverejňeno 31 07 79

(45) Vydáno 30 11 81

196950
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 33/00

[75]

Autor vynálezu: KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA RNDr. Dr.Sc., HORSKÁ LÝDIA
a JURČOVÁ MILENA, BRATISLAVA

(54) Spôsob pestovania kvasiniek produkujúcich väčšie množstvo ergosterolu

Vynález sa týka spôsobu pestovania kvasiniek produkujúcich väčšie množstvo ergosterolu.

Pôvodne sa používali k nahromadeniu ergosterolu pivovarské alebo pekárske kvasnice, teda kultúry napestované v pivnej mladine alebo v melasovej zápare. Neskôr sa pristúpilo k pestovaniu čistých kultúr v tekutých prostriedkoch, prirodzených, ako je sladina alebo melasa, alebo umelo zostavených z minerálnych solí, cukrov a vitamínov. Pretože pre tvorbu ergosterolu je dôležité, aby kultúra mala počas pestovania dostatočný prístup vzduchu, boli tieto kultúry pestované za vetrania alebo na recipročných alebo rotačných trepačkách. Ergosterol sa hromadí v bunkách kvasiniek hlavne rodu *Saccharomyces* a jemu príbuzných rodov, ako napr. *Kluyveromyces*, v množstve 0,1 až 3 %, zatiaľ čo celkové steroly môžu dosiahnuť 10 až 12 %. Celkový prehľad doterajších skúseností s pestovaním a výberom kultúr podávajú: M. Khanna, O. P. Shukla, Indian J. Exptl. Biol. 14, 729, 1976; a C. S. Penman, J. H. Duffus, Ztschr. Allg. Mikrobiol. 16, 483, 1976.

Podstatou vynálezu je spôsob pestovania kvasiniek produkujúcich väčšie množstvo ergosterolu, ktorý sa vyznačuje tým, že sporogénne kmene, ktoré majú kvocient povrch/objem buniek menší alebo rovný 1 sa pestujú na pevných pôdach pokrytých polopriepustnou blanou s prísadou aminokyselín, ktoré majú síru

v molekule a za dostatočného prístupu vzduchu.

Zdĺhavý postup pestovania biomasy kvasiniek v tekutých pôdach na trepačkách, odstreďovanie a vypieranie biomasy sa nahradilo pestovaním na pevných pôdach. Sladinový alebo melasový agar alebo iný sa vylieva do Petriho misiek o priemere 15 až 20 cm a na jeho povrch sa položí celofánová fólia. Kvasinky sa očkujú na povrch tejto fólie a rastú a rozmnožujú sa z látok difundujúcich z agaru cez fóliu. Po napestovaní biomasy sa táto tupou špachtličkou z fólie odstráni, suspenduje vo vode a lyofilizuje. Pre stimuláciu tvorby ergosterolu v biomase producentov sa odporúča pridať do agaru aminokyseliny so sírou v množstve asi 20 mg na 500 ml pôdy.

Obsah ergosterolu sa preveril u 55 zástupcov rodov kvasiniek, pričom sa zistilo, že najlepší producenti ergosterolu sú medzi jednobunkovými kvasinkami z rodov *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Lodderomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, ktorých kvocient povrch/objem je menší ako 1, alebo rovný 1.

Prednožený vynález má význam v tom, že sa týmto postupom vylúči proces odstreďovania kvasiniek, ich vypieranie vodou a opätovné odstreďovanie. Ergosterol sa stanovuje priamo alebo z lyofilizovaných vzoriek. Spôsob pestovania kvasiniek a spôsob výberu kmeňov kvasiniek produkujúcich ergosterol umožňujú

rýchle prešetrovanie sérií kmeňov s dobrým predpokladom úspechu.

Príklad

Kmeň *Saccharomyces cerevisiae*, napr. CCY 21-4-32 alebo CCY 21-4-21 sa zaočkuje do sladiny o 7 % hmot. extraktu a pestuje sa za optimálnej teploty, napr. 28 °C po dobu 72 hodín. Potom sa zmeria 100 buniek na dĺžku a šírku. Z nameraných hodnôt sa stanoví priemery a dĺžko-šírkový pomer (d:š). Zistí sa, že $\bar{d}$ CCY 21-4-32 = $6,57 \pm 0,1014 \mu\text{m}$ a $\bar{s}$ CCY 21-4-32 = $6,09 \pm 0,0993 \mu\text{m}$, d:š = 1,08, P/O = 0,96, alebo $\bar{d}$ CCY 21-4-21 = $7,39 \pm 0,1513 \mu\text{m}$ a $\bar{s}$ CCY 21-4-21 = $6,36 \pm 0,1607 \mu\text{m}$, d:š = 1,16, P/O = 0,90. Kvocient P/O sa zistí z nomogramu (obr. 1). Morfologické parametre poskytujú teda dobré predpoklady, že kmene budú dobrí producenti ergosterolu.

Medzitým sa pripraví sladínový (alebo iný agar) o 7 % hmot. extraktu s prísadou 20 mg L-metionínu na 500 ml a 1,5 % agaru. Sterilný a roztopený agar sa vyleje do Petriho misiek o priemere 15 cm. Na povrch utuženého agaru sa položí kotúč celofánovej fólie o priemere o 1 cm väčšom, ako je priemer misky, takže okraje sa zahýbajú hore a nie je nebezpečie, že suspenzia podtečie pod fóliou. Celofánové fólie sa vopred pokladú do väčších Petriho misiek (priemer 20 cm), poprekladajú kotúčmi filtračného papiera, aby sa nezlepili, a ponorené vo vode sa sterilizujú v prúdiacej pare. Agary s fóliami sa očkujú pripravenou kultúrou na sladínovom agare 24 až 48 hodín starou. Kultúra sa suspenduje do sterilnej vody a má hustotu zhruba 10^7 buniek v 1 ml. 2 ml dobre homogenizovanej suspenzie buniek sa rozotrie po povrchu celofánovej fólie zahnutou sterilnou sklenenou tyčkou, ručne alebo pomocou otáčacieho stolíka. Pritom sa ešte fólia dobre pritlačí k agaru.

Misky sa inkubujú po dobu 3 až 4 dní pri 25 až 28 °C. Za týchto podmienok býva produk-

cia ergosterolu najväčšia. Po inkubácii sa nariadená biomasa opatrne zoškrabe špachtličkou s tupou hranou, aby sa fólia nepotrhalá, a suspenduje vo vode pri hustote asi 10^{10} buniek v 1 ml a lyofilizuje sa to (môže sa však tiež stanoviť ergosterol vo vlhkých kvasinkách priamo).

Alikvótne množstvo lyofilizovaných alebo vlhkých kvasiniek sa zmydľuje 40% KOH, extrahuje éterom, odparí a ergosterol sa stanoví spektrofotometricky po prevedení do etanolu alebo iného rozpúšťadla. Odčíta sa z vrcholu pri 282 nm a prepočítava na % ergosterolu v sušine kvasiniek. Tak z dvanástich stanoví vzorky CCY 21-4-21 bol zistený obsah ergosterolu $3,64 \pm 0,42$ % v sušine biomasy. Tabuľka (viz príloha) ukazuje závislosť medzi obsahom ergosterolu v biomase kvasiniek a ich kvocientom povrch/objem buniek.

Tab. 1. Niekoľko ukážok vzťahu medzi produkciou ergosterolu a kvocientom povrch/objem buniek

Kmeň kvasinky číslo	% ergosterolu v sušine	Kvocient povrch/objem buniek
CCY 21-34-1	0,36	1,75
CCY 21-3-1	0,66	2,14
CCY 48-67	0,73	1,32
CCY 21-50-2	0,79	1,26
CCY 48-78	0,90	1,47
CCY 21-4-13	1,01	1,02
CCY 21-4-56	1,27	1,37
CCY 21-4-18	2,03	1,15
CCY 21-4-1	2,05	0,98
CCY 22-3-42	2,21	1,05
CCY 28-75	2,32	0,95
CCY 21-4-32	2,64	0,96
CCY 21-4-21	3,80	0,90

Poznámka k tab. 1: U 32 kmeňov rodu *Saccharomyces* bola vypočítaná korelácia medzi obsahom ergosterolu a kvocientom P/O. Vypočítaný korelačný koeficient činil — 0,540 (t.j. 54% záporná korelácia, čo znamená, že so znižovaním jednej hodnoty sa zvyšuje druhá).

Predmet vynálezu:

Spôsob pestovania kvasiniek produkujúcich väčšie množstvo ergosterolu, vyznačujúci sa tým, že kmene kvasiniek, ktoré majú kvocient povrch/objem buniek menší ako jedna

alebo rovnaký jednej sa pestujú na pevných pôdach pokrytých polopriepustnou blánou s prísadou aminokyselín, ktoré majú síru v molekule a za prístupu vzduchu.