



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

269 562

(21) PV 8359-87.Q
(22) Prihlásené 20 11 87

(40) Zverejnené 12 09 89
(45) Vydané 29 01 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/16

(75) Autor vynálezu BREIEROVÁ EMÍLIA ing.,
KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA RNDr. DrSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob ochrany kvasiniek proti pôsobeniu veľmi
nízkých teplôt

(57) Účelom spôsobu ochrany kvasiniek proti pôsobeniu veľmi nízkých teplôt je zlepšenie zachovania špecifických vlastností kmeňov kvasiniek. Uvedený účel sa dosiahne tak, že na kvasinku sa pôsobí vodným roztokom obsahujúcim 0,27 až 0,5 hmot. % extracelulárneho kvasinkového polysacharidu a 6 až 12 hmot. % glycerolu alebo dimetylsulfoxidu v pomere 10⁶ až 10⁷ buniek kvasinky k 1 ml tohto roztoku pri teplote 18 až 25 °C a potom sa zmrazí. Zmrazí sa na teplotu kvapalného dusíka. Spôsob ochrany kvasiniek proti pôsobeniu veľmi nízkých teplôt má použitie v mikrobiológii.

Vynález sa týka spôsobu ochrany kvasiniek proti účinku veľmi nízkych teplôt.

Doteraz na ochranu kvasiniek pred pôsobením veľmi nízkych teplôt sa používal 12 hmot. % dimetylsulfoxid [E. D. Meyer, N. A. Sinclair, B. Nagy: Appl. Microbiol. 29, 739 (1975); Z. Hubálek, A. Kocková-Kratochvílová: Folia Microbiol. 27, 242 (1982)]. Kombináciu 12 hmot. % dimetylsulfoxidu, alebo 12 hmot. % glycerolu a 5 hmot. % hydroxyetylškrobom sa docieli hladina prežívania jednotlivých termotolerantných a mezofilných druhov kvasiniek 60 % celkovej populácie buniek [B. E. Kirsop, J. J. S. Snell: Maintenance of Microorganisms, Academic Press, London, 109 (1984)]. Uvedený spôsob má nevýhody v tom, že psychrofilné druhy kvasiniek a mutantné kmene majú hladinu prežívania veľmi nízku 10 až 20%, alebo vôbec neprežívajú.

Podstatou vynálezu spočíva v tom, že na kvasinku sa pôsobí vodným roztokom obsahujúcim 0,27 až 0,50 hmot. % extracelulárnym kvasinkovým glykoproteínom a 6 až 12 hmot. % glycerolu alebo dimetylsulfoxidu v pomere 10^6 až 10^7 kvasinkových buniek k 1 ml tohto roztoku pri teplote 18 až 25 °C a potom sa zmrazí. Zmrazí sa na teplotu kvapalného dusíka.

Výhodou tohto spôsobu ochrany kvasiniek pred pôsobením veľmi nízkych teplôt je, že sa docieli hladina prežívania termotolerantných a mezofilných druhov kvasiniek až do 100 % celkovej populácie a u psychrofilných a mutantných kmeňov kvasiniek 50 až 70 % celkovej populácie kvasiniek pred zmrazením.

Extracelulárny kvasinkový glykoproteín použitý v príkladoch 2 až 8 sa pripraví známym spôsobom [T. Nakajima, C. E. Ballou: J. Biol. Chem. 249, 7679 (1974)]:

Príklad 1

Kultivačné médium (5 000 ml) sa odcentrifuguje od kvasničnej biomasy a odparí pri tlaku 5 kPa za teploty 40 °C na 1/20 pôvodného objemu (250 ml) a glykoproteín sa vyzráža trojnásobným množstvom (750 ml) 96 hmot. % etanolu. Zrazenina glykoproteínu sa odcentrifuguje, potom sa rozpustí v 100 ml destilovanej vody a dialyzuje sa počas 48 hodín pri teplote 4 °C oproti destilovanej vode. Dialyzát sa zlyofilizuje. Získá sa približne 3 g glykoproteínu.

Príklad 2

Prípraví sa kryomédium obsahujúce 7 hmot. % pivovarníckej sladiny, 0,26 g kvasničného extraktu (Serva), 0,5 g peptónu (Difco) a 100 ml vodného roztoku 0,27 hmot. % extracelulárneho kvasinkového glykoproteínu. Kryomédium sa sterilizuje pri teplote 100 °C (Kochov spôsob sterilizácie). Po sterilizácii sa pridá dimetylsulfoxid na obsah 12 hmot. %. Do polyetylénovej inšerminačnej ampulky (bez citrátu sodného) sa sterilne napipetuje 0,5 ml kryomédia a pridá sa suspenzia kvasinkovej kultúry termotolerantného kmeňa napr. Candida albicans CCY 29-3-32 na koncentráciu 10^7 buniek v 1 ml. Ampulka sa teplom zataví, vloží do kvapalného dusíka a udržiava sa pri teplote -196 °C. Po mesiaci, roku a 5 rokov sa ampulka vyberie a vloží do vodného kúpeľa teplého 37 °C na dobu jednej hodiny. Potom sa ampulka otvorí a testuje sa prežívanie zmrazenej populácie buniek kvasiniek, ktoré bolo po mesiaci 100 %, po roku 100 % a po piatich rokoch 100 % celkovej populácie buniek pred zmrazením.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 2 s tým rozdielom, že sa použije kryomédium obsahujúce 6 hmot. % dimetylsulfoxidu. Prežívanie bolo po mesiaci 80 %, po roku 80 % a po piatich rokoch 80 % celkovej populácie buniek pred zmrazením.

Príklad 4

Postupuje sa ako v príklade 2 s tým rozdielom, že sa použije kryomédium obsahujúce 12 hmot. % glycerolu. Prežívanie bolo po mesiaci 95 %, po roku 95 % a po piatich rokoch 95 % celkovej populácie buniek pred zmrazením.

Príklad 5

Postupuje sa ako v príklade 2 s tým rozdielom, že sa použije kryomédium obsahujúce 6 hmot. % glycerolu. Prežívanie bolo po mesiaci 60 %, po roku 60 % a po piatich rokoch 60 % celkovej populácie buniek pred zmrazením.

Príklad 6

Postupuje sa ako v príkladoch 2, s tým rozdielom, že sa použije vodný roztok 0,5 hmot. % extracelulárneho kvasinkového polysacharidu. Prežívanie bolo po mesiaci 60 %, po roku 60 % a po piatich rokoch 60 % celkovej populácie buniek pred zmrazením.

Príklad 7

Postupuje sa ako v príkladoch 2 s tým rozdielom, že sa pridá do kryomédia suspenzia mezofilného kmeňa napr. *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-13. Prežívanie bolo po mesiaci 100 %, po roku 100 %, po piatich rokoch 100 % celkovej populácie buniek pred zmrazením.

Príklad 8

Postupuje sa ako v príkladoch 2 s tým rozdielom, že sa pridá do kryomédia suspenzia psychrofilného kmeňa napr. *Leucosporidium scottii* CCY 64-1-1. Prežívanie bolo 50 % po mesiaci, po roku 50 % a po piatich rokoch 50 % celkovej populácie buniek pred zmrazením.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob ochrany kvasiniek proti pôsobeniu veľmi nízkych teplôt a vnútornou ochranou kvasiniek vodným roztokom glycerolu alebo dimetylsulfoxidu, vyznačujúci sa tým, že na kvasinku sa pôsobí vodným roztokom obsahujúcim 0,27 až 0,5 hmot. % extracelulárneho kvasinkového glykoproteínu a 6 až 12 hmot. % glycerolu alebo dimetylsulfoxidu v pomere 10^6 až 10^7 buniek kvasiniek k 1 ml tohto roztoku pri teplote 18 až 25 °C a potom sa zmrazí.

2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa zmrazí na teplotu kvapalného dusíka.