



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 201 883

(11) (B1)

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 18 12 78

(21) PV 8493-78

(51) Int. Cl. C 12 N 1/14

(40) Zverejnené 31 03 80

(45) Vydané 24 09 83

(75)

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

(54)

Kmeň mikroorganizmu *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-63-e

1

Vynález sa týka kmeňa *Saccharomyces cerevisiae*, ktorý produkuje nad 2 % ergosterolu v sušine.

Kvasinky z rodu *Saccharomyces* sú najdôležitejšími producentmi ergosterolu. Hodnoty, ktoré sa uvádzajú v staršej literatúre sú pomerne nízke. Proskurjakov, Popova a Osipov /*Biochimia* 3:397, 1938/ zistili u kŕmneho droždia *Monilia murmanica* 0,31 %, u *Torula utilis* 0,55 % a u pivovarskej rasy *Frohberg* 2,36 % v sušine. Preto pokladajú pivovarské kvasinky za zvlášť bohaté na ergosterol napr. kmeň 776 mal 2,5 %, vínne 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 *Saccharomyces cerevisiae* až 9 % celkových sterolov. Mitra a Garg /*J. Inst. Brew.* 64:327, 1958/ stanovili u Dharských 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 posledných rokoch. Jelizjan, Marojan a Arumjunian /*Mikrobiologia* 44:632, 1975/ zisťovali obsah celkových sterolov u kvasiniek a potvrdili, že najväčšia produkcia je u sacharomycét, od 1,3 do 3,13 % na sušinu biomasy. Dikanskaja a Robyševa /*Prikl. Biochem. Mikrobiol.* 11:21, 1975/ zisťovali obsah ergosterolu 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: pekárska kvasinka Odesskaja 14 produkuje 2,3 %, ostatné pekárske kvasinky od 1,8 do 1,9 %, liekovarské 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 % ergosterolu v sušine.

Uvedené nevýhody doteraz známych kmeňov kvasiniek odstraňuje vynález, ktorým je nový kmeň mikroorganizmu *Saccharomyces cerevisiae*, uložený v Čs. zbierke kvasiniek, Chemický ústav SAV, Bratislava, Dúbravská cesta, pod číslom CCY 21-4-63-e.

Hlavnou výhodou nového kmeňa je zvýšená produktivita ergosterolu, ktorá dosahuje hodnoty až 6 % na sušinu biomasy.

Kmeň CCY 21-4-63-e vytvára mierne elipsoidné bunky o priemernom dĺžko-šírkovom pomere 1,22, ktorý kvocient povrch/objem je menší ako 1 alebo rovný 1, v 20 % do 1,2. Obsahuje nad 70 % buniek s P/O menším ako 1. Opakovanou selekciou sa môže obsah buniek s P/O menším ako 1 ešte zvýšiť. Obrovské kolónie tohoto kmeňa sú hladké a prirastajú za 100 hodín asi o 1,5 mm. V tekutom prostredí kmeň rýchle sedimentuje, na povrchu nevytvára ani kožku, miazdru ani prstenec.

Kmeň CCY 21-4-63-e po indukcií acetátom dobre sporuluje a môže dosiahnuť až 80 % sporulačných elementov. Z toho je 2,5 askov jednosporových, 18 % dvojsporových, 60 % štvorsporových. Spóry sú guľaté a hladkostenné. K rastu v prostredí potrebujú vitamíny. Pri 5 °C rastie slabó /asi 30 % z rastu pri optimálnej teplote/, pri 42 °C rastie veľmi slabó /13 % z rastu pri optimálnej teplote/, optimálna teplota rastu kultúry je 25 až 28 °C. Kvasí glukózu, maltózu, sacharózu a rafinózu. Tieto cukry tiež asimiluje, neasimiluje dusičnan draselný ani lyzín. Je to kvasinka osmofilná, ktorá znáša až 60 % sacharózy v prostredí, 2 % kyselina mliečna jej rast stimuluje a 2 % kyseliny vínnej znáša dobre. V prostredí znáša ešte 8 % etanolu. Asimiluje etanol, glycerol, metanol a etándiol.

Pôvodný kmeň 21-4-63 /pôvodná kultúra označená "A₂₂MU-TD_{IX} Trenčín/, ktorý tvoril len 10 až 20 % buniek s kvocientom P/O menším ako 1 alebo rovným 1, sa naočkoval v suspenzii 10⁷ buniek.ml⁻¹ na povrch sladínového 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/. Tento kmeň sa označil ako CCY 21-4-63-e.

Kmeň CCY 21-4-63-e sa môže použiť v prevádzke na pestovanie za účelom získania biomasy a to tak klasickým spôsobom na výrobu droždia ako aj kontinuálnym spôsobom, za použitia melasy alebo inej odpadnej cukornatej suroviny, prípadne syntetického etanolu ako zdroja uhlíka. Naprodukováaná, odstredená biomasa sa použije k extrakcii ergosterolu a jeho izolácii. Extrahované zvyšky biomasy sa môžu ďalej spracovať na krmivo alebo

môžu byť využité na získanie iných zložiek biomasy kvasiniek /napr. nukleové kyseliny/.

Kmeň CCY 21-4-63-e sa pestoval na pôde Olson-Jensena umelého zloženia a na indukčnej melasovej pôde na trepačke a kontinuálne. Ergosterol sa stanovil po kultivácii a lyofilizácii alebo priamo s použitím vlhkej biomasy. K stanoveniu sa použila 50 až 100 mg vzorka lyofilizovaných kvasiniek, ktoré 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, prípadne zriedil zmesou chloroform : éter 5:100. Dôraz ergosterolu sa kontroloval registračným spektrofotometrom a množstvo sa počítalo z hodnôt pri vlnovej dĺžke 282 nm.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Kmeň mikroorganizmu *Saccharomyces cerevisiae*, CCY 21-4-63-e, ktorý produkuje ergosterol.