



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 201 882

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/14

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Přihlášeno 18 12 76

(21) PV 8492-78

(40) Zveřejněno 31 03 80

(45) Vydáno 24 02 83

(75)
Autor vynálezu KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA RNDr. DrSc., HRONSKÁ LÝDIA, BRATISLAVA,
BERAN KAREL ing. CSc. a BĚHALOVÁ BOŽENA ing., PRAHA

(54)
Kmeň mikroorganismu *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-67-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. Viac ako 20 rokov ostal výskum v oblasti vitamínu D v stave relatívneho pokoja, stúpol až v posledných rokoch.

Nevýhody z literatúry doteraz známych kmeňov kvasiniek odstraňuje vynález, ktorým je doteraz z literatúry neznámy kmeň mikroorganismu *Saccharomyces cerevisiae*, uložený v Čs. zbierke kvasiniek, Chemický ústav SAV, Bratislava, Dúbravská cesta, pod číslom 21-4-67-e.

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

Kmeň CCY 21-4-67-e vytvára elipsoidné bunky o priemernom dĺžko-šírkovom pomere 1,30, ktorých kvocient povrch/objem je menší ako 1 alebo rovný 1, v 20 % do 1,10. Obsahuje nad 80 % buniek s P/O menším ako 1. Opakovanou selekciou sa môže obsah buniek s P/O menším ako 1 ešte o niečo zvýšiť. Obrovské kolónie tohoto kmeňa sú hladké a mastne lesklé, prirastajú za 100 hodín o 1,57 mm. V tekutom prostredí kmeň sedimentuje, na povrchu nevytvára ani kožku, miazdru ani prstenec.

Kmeň CCY 21-4-67-e po indukcií acetátom dobre sporuluje a môže dosiahnuť až 62 % sporulačných elementov. Z toho je 2 % jednospórových askov, 16 % dvojspórových, 82 % troj- a štvorspórových. Spóry sú hladké a guľaté. K rastu potrebuje vitamíny v prostredí. Pri 5 °C a pri 42 °C rastie slabó, optimálna teplota je 25 až 28 °C. Kvasí glukózu, galaktózu, 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 neovplyvňuje rast, 2 % kyselina vínna inhibuje rast na 50 %. V prostredí znáša 8 % etanolu. Asimiluje etanol, etándiol a metanol.

Pôvodný kmeň CCY 21-4-67 /pôvodná kultúra označená "TK 3 Libáň"/ bol naočkovaný v suspenzii 10^7 buniek.ml⁻¹ na povrch sladínového agaru a do stredu misky na povrch agaru bol uložený kryštálík gáfru. Kultivácia prebiehala v tme pri 28 °C do doby, keď sa objavili na povrchu ojedinelé kolónie kvasiniek. Opakovaným rozsevom na misky 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/. Kmeň produkoval zvýšené množstvo ergosterolu od 3,5 do 6 % na sušinu biomasy. Tento kmeň sa označil ako CCY 21-4-67-e.

Kmeň CCY 21-4-67-e sa môže priemyselne využiť 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. Naprodukovaná, 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 21-4-67-e bol pestovaný na pôde Olsen-Jensena umelého zloženia a na indukčnej pôde na trepačke a kontinuálne. Ergosterol sa stanovil po kultivácii a lyofilizácii alebo s použitím vlhkej biomasy. K stanoveniu sa použila 50 až 100 mg vzorka lyofilizovaných kvasiniek, ktorá sa hydrolyzovala 40 % hydroxidom draselným 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 premyli destilovanou vodou. Čistý éterový extrakt sa odparil v 0,5 ml chloroformu a doplnil etanolom do 10 ml, prípadne zriadil zmesou chloroform:éter 5:100. Ukaz 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 21-4-67-e, produkujúci ergosterol.