

Selekce průmyslového kmene *Saccharomyces cerevisiae* se zvýšenou biosyntézou ergosterolu

663.124 663.12

Ing. JIŘINA PÁSKOVÁ, CSc., Ing. BOHUMIL ŠPAČEK, CSc., Výzkumný ústav koncernu Konzervárny a lihovary, Praha
Ing. BOŽENA BĚHALOVÁ, CSc., Ing. FRANTIŠEK MACHEK, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, ergosterol, syntéza steroidů, selekční tlak, izolace selektátů, kvasničná biomasa, produktivita

Úvod

Pekařské kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* patří do skupiny mikroorganismů, využívaných průmyslově jako surovina pro izolaci některých substancí s uplatněním ve farmacii, lidské výživě nebo kosmetice. Jednou z cenných látek, průmyslově izolovaných z kvasničné biomasy, je steroidní sloučenina ergosterol, používaná jako surovina pro výrobu protikřivického vitamínu D₂ — kalciferolu.

Z hlediska ekonomiky izolačního postupu je žádoucí, aby zpracovávaná kvasničná biomasa obsahovala alespoň 1,5 % ergosterolu v sušině. Obsah ergosterolu v buňkách je jednak primárně určen genotypem použitého produkčního kmene kvasinky, jednak lze jeho obsah v buňce regulovat úpravou kultivačních podmínek, případně použitím prekurzorů biosyntézy steroidních látek [1]. Další možností je zvýšení hladiny syntézy steroidních látek změnou genomu kmene kvasinky. V literatuře je popsána řada selekčních metod, s jejichž pomocí lze zasáhnout do genotypu kmene kvasinky. Z nejznámějších je to hybridizace fúzí protoplastů, konstrukce polyploidů nebo šlechtění s použitím účinku mutagenních látek. Po každém takovémto zásahu následuje empirický výběr nejvhodnějších jedinců po otestování velkého souboru izolátů, přičemž nelze vždy kalkulovat s pozitivním výsledkem.

Vycházejíce z předpokladu, že je obsah ergosterolu v kvasničné biomase dán genotypem použitého kmene kvasinky, provedli jsme nejprve rozsáhlý screening vhodné kultury se zvýšenou hladinou syntézy ergosterolu, která by zároveň splňovala podmínky dobré pekařské kvasinky, jako je vysoký výtěžek sušiny biomasy z jednotky fermentačního objemu a dobrá schopnost kypřit těsto (tzv. mohutnost kynutí). K tomu nás vedla snaha, aby mohla být biomasa, určená pro izolaci ergosterolu, provozně kultivována souběžně s normálním pekařským droždím bez obav ze ztrát, které by mohly vzniknout při náhodné záměně nebo vzájemné kontaminaci.

Celkem jsme vyhodnotili 80 kmenů kvasinek z ústavní sbírky provozních kultur kultivačním testem na rotačním třepacím stroji v melasovém živném médiu. Zjistili jsme, že se jednotlivé kmeny za daných kultivačních podmínek od sebe lišily obsahem ergosterolu, který se pohyboval v rozmezí 0,4 až 2,2 % sušiny biomasy. Jako perspektivní pro další práci byl vybrán kmen *S. cerevisiae* KBD (drážďanská rasa), který z testovaných kmenů syntetizoval nejvíce ergosterolu při současné poměrně nízké hladině obsahu balastního Δ5,7,22,24(28)-ergostatetraen-3,β-olu (dehydroergosterolu), jehož přítomnost zhoršuje krystalizaci ergosterolu a snižuje tak výtěžky v izolační fázi výroby.

Při pokusné kultivaci kmene KBD v podmínkách provozních fermentací s turbínovým aeračním systémem se dosáhlo v průměru zdvojnásobení obsahu ergosterolu v sušině biomasy ve srovnání s běžně používanou provozní hybridní kulturou BMA VII. Kultura KBD však za stejných kultivačních podmínek vykazovala nižší výtěžky biomasy (v průměru o 18 %) vedle další nepříznivé vlastnosti — podstatně menších rozměrů buněk, které pak byly příčinou vyšších ztrát biomasy úletem buněk při separaci za současně vyššího zatížení čistírny odpadních vod.

Selekční postup

S použitím metody působení selekčního tlaku jsme se pokusili nalézt izolát, který by měl vysokou schopnost syntetizovat ergosterol a zároveň byl také adaptován na

růst v podmínkách provozních kultivací, aby zároveň ve vysoce aerobním přítokovém (fed-batch) systému produkoval vysoké výtěžky biomasy. Východí kultura *Saccharomyces cerevisiae* KBD byla vedena z laboratoře (1 očkovací klička buněk ze šikmého agaru je asi 3,5 · 10⁷ buněk) šesti kultivačními stupni v podmínkách provozní výroby pekařského droždí až do konečných 6 × 60 tun fermentačního objemu expedičních kádí, tj. asi 60 tun lisovaného droždí (6 · 10¹⁷ kvasničných buněk). Během tohoto procesu došlo v průběhu 10 až 12 dnů k desetiřádkovému zmnožení původního počtu buněk v podmínkách semisterilní kultivace za silné aerace, míchání a těžko definovatelného působení řady vnějších faktorů, kdy vedle autoselekce nejodolnějších klonů mohlo dojít i ke vzniku a pomnožení buď spontánních, nebo těmito vnějšími vlivy indukovaných mutantů. Z buněk vyrostlých v posledním kultivačním stupni (tzv. expediční droždí) pak byla připravena vodní suspenze buněk a dále zředěna sterilním fyziologickým roztokem tak, aby 1 ml této suspenze obsahoval asi 20 živých buněk. Z této zředěné suspenze buněk byl proveden rozsev na Petriho misky s agarovou půdou. Sterilní zahnutou skleněnou tyčinkou bylo po povrchu půdy v každé misce rozetřeno 0,25 ml suspenze a naočkované misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 30 °C. Pak byly jednotlivé kolonie rozočkovány do zkumavek se šikmými agarovými půdami a tak izolovány čisté jednobuněčné klony. Jednotlivé selektáty se potom hodnotily kultivačním testem na rotačním třepacím stroji v melasové živné půdě a testovala se rychlost jejich růstu a výtěžky biomasy v přepočtu na 1 litr živného média. Procentní obsah sterolů 5,7dierového kruhu v sušině biomasy (Δ5,7) byl vyhodnocován spektrofotometrickou metodou při λ = 282 nm, % dehydroergosterolu (D) při λ = 230 nm a z jejich rozdílu vypočteno % ergosterolu (E) v sušině biomasy.

Výsledek selekce

Ze souboru 20 hodnocených izolátů měl nejvhodnější vlastnosti klon označený jako D₇, který se vyznačuje zvýšeným obsahem ergosterolu a vyšším nárůstem biomasy ve srovnání s východí kulturou pekařské kvasinky rasy KBD. Při posuzování obou kultur pod mikroskopem bylo pozorováno, že nový izolát D₇ se lišil od východí kultury poněkud většími rozměry buněk. Výsledky kultivačního testu, ve kterém se porovnávala východí kultura KBD a nový izolát D₇ z hlediska schopnosti hromadit biomasu a hladiny syntézy jednotlivých steroidních látek, dokumentuje tabulka 1.

V přepočtu na 1000 ml živného melasového média syntetizovala východí kultura *Saccharomyces cerevisiae* KBD v podmínkách kultivace na rotačním třepacím stroji za 42 hodin kultivace 200 mg ergosterolu, kdežto nový izolát D₇ za stejných kultivačních podmínek 291 mg ergo-

Tabulka 1. Nárůst sušiny biomasy a biosyntéza sterolů po 42 h kultivace na rotačním třepacím stroji

Kmen	Sušina biomasy (g · l ⁻¹)	Obsah sterolů v sušině biomasy			mg ergosterolu z 1000 ml média
		% Δ 5,7	% D	% E	
KBD	9,5	3,71	1,61	2,10	200 = 100 %
D ₇	11,5	3,94	1,41	2,53	291 = 146 %

Δ 5,7 — obsah sterolů 5,7dierového kruhu v sušině biomasy
D — obsah dehydroergosterolu v sušině biomasy
E — obsah ergosterolu v sušině biomasy

sterolu, tedy o 46 % více. Izolát *D₇* jsme deponovali do čl. sbírky kvasinek při Chemickém ústavu SAV v Bratislavě, kde je veden s označením CCY 21-4-80 a zároveň přihlásili jako nový průmyslový mikroorganismus v Úřadu pro vynálezy a objevy (PV 3033-85, číslo vynálezu 247797 ze dne 6. 11. 1986).

Nový kmen byl pak prověřen v podmínkách provozních fermentací v porovnání s výchozí kulturou KBD a zjistilo se průměrné zvýšení teoretického výtěžku ergosterolu v průměru o 27 % ve srovnání s výchozí kulturou rasy KBD.

Literatura

- [1] PÁSKOVÁ, J., ŠPAČEK, B., LIST, J.: Kvas. prům. 32, 1986, s. 236.
- [2] BĚHALOVÁ, B.: Využití *Saccharomyces cerevisiae* pro výrobu kvasničného autolyzáta a ergosterolu. [Kandidátská disertační práce] 1983, MBOČSAV, Praha.
- [3] HARRISON, J. S.: Yeast Production, 1971, Progress in Industrial Microbiol., 10, s. 129.
- [4] BURROWS, S.: Bakers Yeast, Economic Microbiology, Vol. 4, ed. by A. H. Rose, 1979, Acad. Press, s. 31—64.
- [5] Kmen mikroorganismu *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-80. A. o. č. 247797 (PV 3033-85 Z).

Lektoroval Ing. Josef Fabián, CSc.

Pásková, J. - Špaček, B. - Běhalová, B. - Machek, F.: Selekcce průmyslového kmene *Saccharomyces cerevisiae* se zvýšenou biosyntézou ergosterolu. Kvas. prům. 33, 1987, č. 7, s. 198—199.

Kmen pekařské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* KBD byl vystaven selekčnímu tlaku tím, že byl veden šesti kultivačními stupni v podmínkách provozní výroby droždí. Z konečného produktu — lisovaného droždí byla provedena selekce a izolován selektát *D₇*, který se liší od výchozí kultury větší průměrnou velikostí buněk, vyšším nárůstem biomasy, zvýšeným obsahem ergosterolu ve směsi syntetizovaných steroidů. V podmínkách provozních fermentací se s použitím izolátu *D₇* zvýšil teoretický výtěžek z jednotky fermentačního objemu v průměru o 27 % ve srovnání s výchozím kmenem *Saccharomyces cerevisiae* KBD.

Паскова, И. - Шпачек Б. - Бегалова Б. - Махек, Ф.: Селекция промышленного штамма *S. cerevisiae* с повышенным биосинтезом эргостерина. Квас. прум. 33, 1987, №7, стр. 198—199.

Штамм хлебопекарных дрожжей *S. cerevisiae* KBD подвергли селективному давлению тем, что он был веден шести степенями культивирования в условиях хода производства дрожжей. Из конечного продукта — прес-

сованных дрожжей была проведена селекция и изолирован селектат *D₇*, который отличался от исходной культуры большей средней величиной клеток, более высоким приростом биомассы, повышенным содержанием эргостерина в сухом веществе клеток и лучшим отношением эргостерина в смеси синтезированных стероидов. В условиях промышленных процессов ферментации с применением изолята *D₇* повысился теоретический выход эргостерина из единицы ферментного объема в среднем на 27 % по сравнению с исходным штаммом *S. cerevisiae* KBD.

Pásková, J. - Špaček, B. - Běhalová, B. - Machek, F.: Selection of Industrial Strain of *S. cerevisiae* with an Increased Biosynthesis of Ergosterol. Kvas. prům. 33, 1987, No. 7, pp. 198—199.

The baker's yeast strain *S. cerevisiae* KBD was selected during the six-stage cultivation under conditions of an industrial yeast production. The selection was performed from the final product (pressed yeast). The isolated strain *D₇* has the following differences in comparison to the parent strain: the cells are larger, higher biomass yield, the content of ergosterol in the cell dry weight is higher, the fraction of ergosterol in the steroid mixture is higher. Using the strain *D₇* a higher theoretical yield from the fermentation volume by 27 % in comparison with the parent strain was achieved under conditions of industrial fermentations.

Pásková, J. - Špaček, B. - Běhalová, B. - Machek, F.: Selektion eines industriellen Stammes *S. cerevisiae* mit erhöhter Ergosterol-Biosynthese. Kvas. prům. 33, 1987, Nr. 7, S. 198—199.

Der Backhefestamm *S. cerevisiae* KBD wurde dem Selektionsdruck ausgesetzt, indem er über sechs Kultivationsstufen in den Bedingungen der betrieblichen Backhefeerzeugung geführt wurde. Aus dem Endprodukt — gepresster Backhefe — wurde in der Selektion das Selektat *D₇* isoliert, das sich von der Ausgangskultur durch mehrere Parameter unterscheidet: grössere Durchschnittsgrösse der Zellen, grösseres Wachstum der Biomasse, höherer Ergosterolgehalt in der Zellentrockensubstanz, günstigeres Verhältnis des Ergosterols in dem Gemisch der synthetisierten Steroide. In den Bedingungen der Betriebsfermentationen wurde bei Anwendung des Isolats *D₇* eine Erhöhung der theoretischen Ausbeute aus der Einheit des Fermentationsvolumens im Durchschnitt um 27 % im Vergleich mit dem Ausgangsstamm *S. cerevisiae* erzielt.