

Úschova produkčných kvasinkových druhov v kvapalnom dusíku

EMÍLIA BREIEROVÁ – ANNA KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ

Súhrn. V kvapalnom dusíku sme uschovávali počas dvoch až piatich rokov dve skupiny kvasinkových organizmov. Jednu skupinu tvorili kmeny rodu *Candida* zahŕňajúce producentov kŕmnej biomasy a kmeny vyskytujúce sa ako kontaminanty v potravinárskom priemysle. Druhá skupina obsahovala kultúry rodu *Saccharomyces* používané v potravinárskom priemysle. Testované kmeny neprejavili odchýlky od základných charakteristík v porovnaní so zbierkovými kmeňmi uschovávanými na šikmom sladinovom agare pod parafínovým olejom. Všetky kmeny výborne preživali. U kmeňov *C. utilis* sme zistili, že úschova v kvapalnom dusíku neovplyvňuje tvorbu zhlukov ani priebeh rastových kriviek.

Použitie mikrobiálnych kultúr v potravinárskom a krmovinárskom priemysle je spojené s problémom zachovania technologických vlastností produkčných kmeňov. Pri udržiavaní kultúr kvasiniek sa používajú tri základné typy úschovných metód. Klasickým spôsobom úschovy (najčastejšie používaným) je udržiavanie kultúr na šikmom sladinovom agare pod parafínovým olejom, pričom sa docieli spomalenie ich metabolizmu. Pri dlhodobej úschove sa však vyžaduje periodické preočkovanie. Takto môže nastať selekcia klonov s odlišnými morfológickými vlastnosťami, ako mala pôvodná kultúra. Ďalšou metódou je lyofilizácia, ktorá sa ukázala nevhodná na dlhodobú úschovu. Lyofilizované kmeny kvasiniek veľmi slabo prežívajú a často vznikajú respiračno-deficitné mutanty [1]. Zachovanie charakteristických vlastností uschovávaných kultúr najlepšie zabezpečuje metóda kryoochrany v kvapalnom dusíku. Ultranižka teplota spôsobuje úplné zastavenie metabolizmu daného mikroorganizmu. Nevýhodou tohto postupu však je, že pri úschove v kvapalnom dusíku sa môžu počas zmrazenia a pri ohreve poškodiť membránové systémy, a to jednak vznikom ľadových kryštálov, ako aj osmotickým šokom [2]. Proti vzniku takýchto poškodení a na dosiahnutie dobrého konzervačného

Ing. Emília Breierová, RNDr. Anna Kocková-Kratochvílová, DrSc., Chemický ústav, Centrum chemického výskumu SAV, Dúbravská cesta 9, 84 238 Bratislava.

účinku biologického materiálu je nevyhnutné používať kryoprotektívne látky. Prostredie, ktoré sa často používa pri lyofilizácii (sacharózo-želatínové médium alebo mlieko), nezabezpečuje dokonalú ochranu proti mrazu ani vtedy, ak sa použijú kryoprotektíva [3–5].

Materiál a metódy

Všetky testované kmene kvasiniek pochádzajú z Československej zbierky kvasiniek (akronym CCY), Chemický ústav, CCHV SAV, Bratislava. Vlastnosti testovaných kmeňov sú uvedené v Katalógu kultúr kvasiniek [6].

Ako živné médiá na rekultiváciu zmrazenej kultúry P 31 [4] sme použili: glukózu (10 g/l), kvasničný extrakt Difco (6 g/l), peptón Difco (3 g/l), hydrolyzát kazeínu Difco (5 g/l), agar (15–20 g/l). Melasová pôda na vyhodnotenie rastu a vložkovatenia kmeňov *C. utilis*: melasa Slovlik (200 g/l), síran amónny (6 g/l), superfosfát (8 g/l), síran horečnatý kryštalický (0,5 g/l). Potom sme pridali 0,2 mol/l kyseliny sírovej (1,5 ml/100 ml) a varili 1 h. Pôdu sme nechali 3–5 h číriť, sfilterovali sme ju a reakciu upravili na pH 6,8.

Kryomédium: sladina s hustotou extraktu 7 % s pridaním kvasničného extraktu (0,26 g/100 ml), peptónu Difco (0,5 g/100 ml) a telacieho séra (7,5 ml/100 ml) – médium M₁. Sladina s hustotou extraktu 7 % s pridaním kvasničného extraktu (0,26 g/100 ml), peptónu Difco (0,5 g/100 ml) a kvasinkového extracelulárneho glykoproteínu (0,27 g/100 ml) – médium M₂ [7]. Do oboch médií sme po sterilizácii pridali dimetylsulfoxid Merck (10 ml/100 ml). Do polyetylénových ampulí (Koh-i-noor, Dalečín) s obsahom 2 ml sme napipetovali 0,5 ml kryomédiu a 0,1 ml vodnej suspenzie kultúry, ktorá obsahovala 10⁶–10⁷ buniek v 1 ml. Suspenziu sme robili u kmeňov rodu *Candida* z kultúr rôzneho veku, a to po 3 a 6 dňoch rastu na šikmom sladinovom agare pri teplote 28 °C. U kmeňov rodu *Saccharomyces* kultúry rástli 6 dní na šikmom sladinovom agare pri teplote 28 °C. Postup pri ukladaní kultúr do kvapalného dusíka, ohrev po piatich a dvoch rokoch a stanovenie prežívania sme robili podľa práce [8]. Stabilitu fyziologických vlastností kultúr sme vyhodnocovali metódou kódovania [9]. Údaje na zostrojenie rastových kriviek sme získali meraním absorbancie $\lambda = 660$ nm na spektrofotometri Specol (C. Zeiss, Jena). Zhlukovanie buniek sme posudzovali počítaním buniek v zhlukoch. Priemer sme počítali z 50 zhlukov. Morfogeneticky boli hodnotené kultúry obrovskými kolóniami. Podľa odchýlok možno zistiť, či zmrazením a následným ohrevom nastalo poškodenie kultúry.

Výsledky a diskusia

Úschova v kvapalnom dusíku je veľmi výhodná pre priemyselné produkčné kmene, pretože dobre prežívajú a zachovávajú si charakteristické vlastnosti. Kmene rodu *Saccharomyces* preživali na 66,6 až 100 % (tab. 1). U kultúr rodu *Candila* sme zistili, že zmrazením staršej kultúry (6 dní rastu na šikmom

Tabuľka 1. Prežívanie mrazovo-ohrevového procesu kmeňov rodu *Saccharomyces*
Table 1. Surviving the freeze-thawing process of strains of *Saccharomyces* genus

| Druh ¹ | Číslo CCY ² | Prežívanie ³ [%] |
|--------------------------|------------------------|-----------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> | 21-4-83 | 66,6 |
| | 21-4-84 | 100 |
| | 21-4-13 | 66,6 |
| <i>S. oviformis</i> | 21-21-14 | 100 |
| <i>S. carlsbergensis</i> | 48-87 | 100 |

Podľa vizuálnej rozterovej metódy [10] za použitia kryomédia M₂. Čas úschovy 2 roky.

According to visual spread method [10] using M₂ cryomedium. Stored for 2 years.

Species; ²Number of CCY; ³Surviving.

sladinovom agare) sa zvýši prežívanie oproti mladšej kultúre (3 dni rastu – tab. 2). Keďže niektoré kmene sa v priemysle používajú na produkciu kŕmneho droždia (*C. utilis*), overili sme nielen ich základné charakteristiky, ale aj vlastnosti, od ktorých závisí plynulý priebeh kontinuálnej prevádzky produkcie biomasy. Úschova uvedených kmeňov v kvapalnom dusíku neovplyvňuje rast kultúr ani tvorbu zhlukov buniek, tzv. nesexuálnu aglutináciu, ktorá je častou príčinou predčasného odstavenia fermentov. Rast kultúry sme posudzovali pomocou rastových kriviek a porovnaním s kultúrami uschovávanými na šikmom sladinovom agare pod parafrínovým olejom. Rastové krivky boli takmer vo všetkých prípadoch podobné a ukázali, že fáza zdržania rastu (lag fáza) je obmedzená na minimum, alebo sa vôbec neprejaví. To má výhodu, lebo rýchly nárast kultúry po zaočkovaní zabraňuje vzniku a rozšíreniu prípadnej kontaminácie. Zhlukovanie buniek sa prejavilo len u štyroch kmeňov z 13 uvedených v tabuľke 2. U troch kmeňov uschovávaných v kvapalnom dusíku bolo zhlukovanie menšie ako u kmeňov uschovávaných pod parafrínovým olejom. Iba u jedného kmeňa bolo približne rovnaké (tab. 3).

Predpokladáme, že u mladších kultúr nastáva čiastočné poškodenie, keďže ich membránový systém nie je natoľko vhodný na zmrazenie ako u starších

Tabuľka 2. Vplyv veku kultúry na prežívanie mrazovo-ohrevového procesu
Table 2. Influence of the culture age on surviving the freeze-thawing process

| Druh ¹ | Číslo CCY ² | Prežívanie ³ [%] | |
|----------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------------|
| | | kultúra stará ⁴ | |
| | | 6 dní ⁵ | 3 dní ⁶ |
| <i>Candida</i> | 29-38-1 | 66,6 | 66,6 |
| | 29-38-2 | 66,6 | 66,6 |
| | 29-38-3 | 66,6 | 50,0 |
| | 29-38-4 | 91,7 | 58,3 |
| | 29-38-5 | 91,7 | 58,3 |
| | 29-38-16 | 50,0 | 41,7 |
| | 29-38-17 | 50,0 | 25,0 |
| | 29-38-18 | 100 | 25,0 |
| | 29-38-22 | 58,3 | 25,0 |
| | 29-38-72 | 100 | 91,7 |
| | 29-38-75 | 72,0 | 25,0 |
| | 29-38-79 | 91,7 | 58,3 |
| | 29-38-81 | 100 | 75,0 |
| | 29-27-1 | 54,2 | 33,3 |
| <i>C. guilliermondii</i> | 29-4-1 | 91,7 | 66,6 |
| | 29-4-2 | 58,3 | 58,3 |
| | 29-4-13 | 100 | 100 |
| | 29-4-14 | 91,7 | 91,7 |
| | 29-4-20 | 16,7 | 16,7 |
| <i>C. parapsilosis</i> | 29-20-5 | 100 | 91,7 |
| | 29-20-8 | 100 | 91,7 |
| | 29-20-9 | 100 | 91,7 |
| | 29-20-10 | 50,0 | 25,0 |
| <i>C. mycoderma</i> | 29-20-11 | 66,7 | 50,0 |
| <i>C. parapsilosis</i> | 29-20-13 | 100 | 91,7 |
| <i>C. membranaefaciens</i> | 29-24-1 | 100 | 66,6 |
| | 29-51-1 | 100 | 58,3 |
| <i>C. krusei</i> | 29-61-1 | 100 | 91,7 |
| <i>C. lusitanae</i> | 29-59,1 | 100 | 91,7 |

Podľa vizuálnej rozterovej metódy [10] za použitia kryomédia M₁. Čas úschovy 5 rokov.
According to visual spread method [10] using M₁ cryomedium. Stored for 5 years.
For 1–3 see Table 1. ⁴Culture old; ⁵6 days; ⁶3 days.

kultúr. Vhodnosť membránového systému buniek na zmrazenie závisí od kyseliny olejovej, schopnosti kultúry skvasovať sacharidy. Ako je známe, staršie kultúry majú vyšší obsah kyseliny olejovej v lipidoch, preto odporúčame zmrazovať kultúry až ku koncu exponenciálnej fázy alebo na začiatku stacio-

Tabuľka 3. Vločkovatenie buniek kmeňov *C. utilis* na melasovej pôde po 27 h
Table 3. Cell flocculating of *C. utilis* strains on molasses medium after 27 h

| Kmeň CCY ¹ | Priemerný počet buniek v zhluku ² |
|-----------------------|--|
| 29-32-2 a | 4,5 ± 0,6 |
| b | 0 |
| 29-38-16 a | 39,0 ± 5,5 |
| b | 43,9 ± 4,5 |
| 29-38-17 a | 2,7 ± 0,4 |
| b | 0 |
| 29-38-79 a | 17,0 ± 3,1 |
| b | 2,8 ± 0,4 |

a – zbierková kultúra uschovávaná na šikmom sladínovom agare pod parafínovým olejom; Collection culture stored on the malt agar under paraffine oil.

b – kultúra uschovávaná v kvapalnom dusíku; Culture stored in liquid nitrogen.

¹Strain; ²Average number of cells in a flocs.

nárnej fázy rastu. Takýmto spôsobom úschovy sa zabezpečí zachovanie charakteristických vlastností kultúr, ktoré môže byť ohrozené preočkovaním (selekciou), prípadne prispôbením sa úschovnému médiu.

Literatúra

- [1] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. – BREIEROVÁ, E. – KOVAČOVSKÁ, R., Studie Biophys., 112, 1986, s. 85.
- [2] KOMATSU, Y. – SATO, M. – OSUMI, M., J. Ferment. Technol., 65, 1987, s. 127.
- [3] BREIEROVÁ, E. – KOVAČOVSKÁ, R. – KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., Biológia (Bratislava), 42, 1987, s. 239.
- [4] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. – BREIEROVÁ, E. – KOVAČOVSKÁ, R., Studia Biophys., 112, 1986, s. 83.
- [5] HOHL, H.R. – ISELIN, K., Liquid nitrogen preservation of zoosporic fungi. In: Zoosporic Fungi in Teaching and Research. Athens, GA, SEPC 1987, s. 143.
- [6] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., Catalogue of Yeast Culture. Bratislava, Veda 1977.
- [7] BREIEROVÁ, E. – KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., Spôsob ochrany kvasiniek proti pôsobeniu veľmi nízkych teplôt. Čs. patent PV 8359, 1987.
- [8] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. – KOVAČOVSKÁ, R., Folia Microbiol., 31, 1986, s. 361.
- [9] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. – SLÁVIKOVÁ, E., Biológia (Bratislava), 40, 1985, s. 305.
- [10] ŠOUREK, J. – MANYCH, J., Mykosen, 12, 1969, s. 363.

Резюме

В жидком азоте в течение с двух до пяти лет хранились две группы дрожжевых микроорганизмов. Одну из групп составляли штаммы рода *Candida*, включающие производители кормовой биомассы и штаммы, встречающиеся в качестве загрязнителей в пищевой промышленности. Вторая группа содержала культуры рода *Saccharomyces*, применяемые в пищевой промышленности. У испытуемых штаммов не наблюдались никакие отклонения от основных характеристик по сравнению с коллекционными штаммами, хранеными на наклонном солодовом агаре под парафиновым маслом. Все штаммы отлично переживали. У штаммов *C. utilis* было обнаружено, что хранение в жидком азоте не показывает влияние ни на образование агрегатов, ни на ход кривых роста.

Storage of production yeast species in liquid nitrogen

Summary

Two groups of yeast organisms were stored in liquid nitrogen from two to five years. One group consisted of strains of genus *Candida*, which include producers of food biomass and the strains occurring as contaminants in food industry. The other group included cultures of genus *Saccharomyces*, which are used in food industry. The tested strains did not show any deviations from the basic characteristics in comparison with collection strains stored on the inclined malt aggar under a paraffine oil. All strains have survived very good. For strains *C. utilis* we found that the storage in liquid nitrogen did not influence the flocs formation as well as the course of growing curves.