



Patent dodatkowy

do patentu nr _____

Zgłoszono: 29.08.77 (P. 200523)

Pierwszeństwo: 30.08.76 Japonia

Zgłoszenie ogłoszono: 22.05.78

Opis patentowy opublikowano: 29.02.1980

Int. Cl.² A01H 15/00
C12K 1/00
C12D 13/04

Twórcy wynalazku: Chikao Yoshikumi, Yoshio Omura, Toshihiko Wada,
Hiromitsu Makita, Takao Ando, Noriyuki Toyoda,
Kenichi Matsunaga

Uprawniony z patentu: Kureha Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha, Tokio
(Japonia)

Sposób wytwarzania nowej monokariotycznej grzybni *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowej monokariotycznej grzybni *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., będącego znanym podstawczakiem, należącym do rodzaju *Coriolus* rodziny Polyporaceae.

Znana jest przydatność polisacharydów, otrzymywanych drogą ekstrakcji *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., względnie jego kultury, jako podstawowych składników przy produkcji leków lub żywności i napojów. Czyniono różne próby produkowania tego podstawczaka drogą wysokowydajnej sztucznej hodowli, lecz mimo to nie istnieje dotąd korzystny sposób rozmnażania podstawczaka z dużą wydajnością.

W toku badań, mających na celu uzyskanie wysokowydajnego rozmnażania *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., nieoczekiwanie stwierdzono, że gdy hodowlę w zanurzeniu tego podstawczaka połączy się z mechaniczną obróbką typu ścinania lub rozcierania w ciekłym środowisku, podstawczak traci swą spoistą budowę, będącą cechą charakterystyczną jego morfologii wewnętrznej i zmienia się w grzybnie monokariotyczną. Uzyskana tym sposobem monokariotyczna grzybnia jest trwała i ma tę szczególną właściwość, że wykazuje wyjątkowo dużą prędkość rozmnażania w porównaniu ze znaną grzybnia dwukariotyczną.

Przedmiotem wynalazku jest przeto sposób wytwarzania nowej trwałej monokariotycznej grzybni *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., nie wykazującej

2

budowy spoistej, a cechą tego sposobu jest to, że pełną brzeczkę fermentacyjną, zawierającą aktywnie rozmnażającą się dwukariotyczną grzybnie *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., 5% wagowych glikozy i 0,75% wagowego ekstraktu drożdży, poddaje się w trakcie hodowli obróbce mechanicznej drogą ścinania lub rozcierania, przy czym obróbkę mechaniczną, mającą charakter ciągły lub okresowy, prowadzi się co najmniej raz w czasie trwania całego procesu hodowli, wewnątrz lub na zewnątrz naczynia fermentacyjnego.

Na rysunku fig. 1 przedstawia krzywą rozmnażania w napowietrzanej i poddawanej mieszaniu hodowli monokariotycznej grzybni, otrzymanej z *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. sposobem według wynalazku i dla porównania podobną krzywą rozmnażania znanej grzybni dwukariotycznej, fig. 2 i 4 przedstawiają mikroфотоgrafie grzybni dwukariotycznej, otrzymanej ze skosu kultury *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., a fig. 3 przedstawia mikroфотографиę grzybni monokariotycznej, otrzymanej sposobem według wynalazku.

Na wykresie na fig. 1 wartości stężenia grzybni (g) litr w pożywce odłożono na osi rzędnych, a długość czasu hodowli (godziny) na osi odciętych. Krzywa (I) odpowiada krzywej wzrostu grzybni dwukariotycznej, a krzywa (II) krzywej wzrostu grzybni monokariotycznej.

Uważa się na ogół, że grzyby będące grzybami jadalnymi wytwarzają basidiospory, które kiełkują

tworzą pierwotną grzybnię, zawierającą zwykle monokariony, po czym grzybnia ta zlewa się, tworząc grzybnię wtórną, zawierającą dwukariony. Twierdzi się, że monokariotyczna grzybnia nie ma zdolności wytwarzania owocników, którą to zdolność ma grzybnia dwukariotyczna. Brak jest informacji o rozmnożeniu monokariotycznej grzybni z zarodników *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. Co więcej, biała napowietrzna grzybnia, otrzymywana w toku badań drogą hodowli zarodników, była grzybnią dwukariotyczną i prawdopodobnie jest to związane z faktem, iż monokariotyczna grzybnia z zarodników ulega bardzo szybkiej przemianie w grzybnię dwukariotyczną.

Monokariotyczną grzybnię, otrzymaną z grzybni dwukariotycznej sposobem według wynalazku, można utrzymać w stanie trwałym, wykazującym znaczne różnice w stosunku do istniejącej grzybni dwukariotycznej. W tablicy przedstawiono różnice między monokariotyczną grzybnią *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., wytworzoną sposobem według wynalazku i grzybnią dwukariotyczną.

Tablica

Przedmiot badania	Grzybnia dwukariotyczna	Grzybnia monokariotyczna wytworzona sposobem według wynalazku
1	2	3
Postać		
1. Hodowla w zanurzeniu	Brak rozproszenia	Rozproszenie
2. Hodowla na płytce	Tworzy się grzybnia napowietrzna	Brak grzybni napowietrznej
Badania mikroskopowe		
3. Tworzenie się budowy sporej	Zaobserwowano	Nie zaobserwowano
4. Kształt grzybni	Długa i cienka	Krótką i o wiele grubsza niż grzybnia dwukariotyczna
Właściwości fizjologiczne i biochemiczne		
5. Prędkość rozmnażania	Mala	Duża
6. Przyswajanie celulozy	Wynik dodatni	Wynik słabo dodatni
7. Azotan potasowy jako jedyne źródło azotu	Brak wzrostu	Wzrost

1	2	3
8. Witamina B ₁	Potrzebna	Niepotrzebna
9. Mleczko lakmusowe w pożywce	Odczyn kwaśny	Brak odczynu kwaśnego

Dalsze fakty, stwierdzone w związku z podanymi w tablicy właściwościami poszczególnych grzybni, są następujące. Zwykła grzybnia dwukariotyczna, otrzymana znanym sposobem z hodowli *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., ma na ogół postać grudek. Pochodząca z hodowli monokariotyczna grzybnia nie tworzy grudek i kultura jej staje się mętna, tak jak papkowata zawiesina w wodzie, co stanowi oczywistą różnicę w stosunku do zwykłej grzybni dwukariotycznej. Sposób liczenia jąder w komórce, który został opracowany do końca po raz pierwszy w związku z wynalazkiem polega na zastosowaniu następujących środków i metod:

Najpierw do grzybni podstawczaka dodaje się utrwalającego płynu Helly'ego, a następnie grzybnię odstawia się zwykle na około 24 godziny, po czym przemywa się ją wodą do odbarwienia. Tak otrzymaną grzybnię zanurza się w 1n roztworze kwasu solnego i roztwór ten podgrzewa do temperatury 60°C. Po ochłodzeniu grzybni do temperatury pokojowej i przemyciu wodą, zanurza się ją w roztworze kwasu azotowego o 20—50-krotnym rozcieńczeniu, po czym ponownie przemywa wodą. Czas zanurzenia w roztworze kwasu solnego wynosi 10—20 minut, a w roztworze kwasu azotowego kilku minut. Otrzymane w ten sposób włókniste komórki rozpościera się na szkiełku przedmiotowym, pozostawia na nim do czasu wyparowania wilgoci, a następnie dodaje kroplami roztwór Giemsa'ego. Po zakończeniu zabarwiania roztworem (w przybliżeniu po 10 minutach), komórki przemywa się ostrożnie wodą, a następnie suszy. Wysuszone komórki bada się pod mikroskopem powiększającym 1000-krotnie, licząc okrągłe zabarwione na czerwono plamki odpowiadające jądom. Tak więc dzięki policzeniu zabarwionych na czerwono plamek określić można liczbę jąder w jednej komórce.

Stosowany tu „utrwalający płyn Helly'ego” jest roztworem, którego podstawę sporządza się, rozpuszczając 2,5 g dwuchromianu potasowego, 1 g siarczanu sodowego i 5 g chlorku rtęciowego w 100 ml wody. Do tego roztworu podstawowego dodaje się bezpośrednio przed użyciem formaliny w ilości 5 ml na 100 ml roztworu.

„Roztwór Giemsa'ego” jest roztworem do barwienia jąder, otrzymywanym przez rozpuszczanie 3 g błękitu II eozyny i 0,8 g błękitu w 250 ml gliceryny podczas ogrzewania ich do temperatury 60°C, następnie przez dodanie 250 ml alkoholu metylowego, odstawienie mieszaniny na 24 godziny i odsączenie roztworu. Przed użyciem otrzymany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńcza się, dodając buforowego roztworu kwasu fosforowego (wartość pH=6,4—6,8) w ilości 100 ml na 3 ml roztworu podstawowego.

W wyniku pomiarów, prowadzonych powyższą metodą, stwierdzono, że liczba jąder w jednej komórce zwykłej grzybni w postaci grudek wynosi 2, podczas gdy w jednej komórce zawieszinowej grzybni, wytworzonej sposobem według wynalazku, znajduje się jedno jądro.

Sposób według wynalazku można realizować następującymi drogami:

(1) W przypadku poddawania dwukariotycznej grzybni *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. hodowli wstrząsowej, grzybnie rozciera się za pomocą stałych ziarnistych materiałów, np. szklanych kulek.

(2) W przypadku poddawania dwukariotycznej grzybni hodowli ciągłej w zanurzeniu, grzybnie poddaje się ścinaniu za pomocą elementu mieszającego.

(3) Pełną brzeczkę hodowlaną otrzymaną z hodowli grzybni dwukariotycznej i zawierającą aktywnie rozmnażającą się grzybnie dwukariotyczną wydobywa się okresowo z naczynia fermentacyjnego (co najmniej raz) i poddaje się ścinaniu lub rozcieraniu w homogenizatorze do momentu, w którym przestają być widoczne grudki grzybni, a następnie zhomogenizowaną pełną grzeczkę hodowlaną umieszcza się znowu w naczyniu fermentacyjnym i podejmuje hodowlę.

Podczas wytwarzania monokariotycznej grzybni w wyżej podanych warunkach korzystne jest dodatkowe zastosowanie następujących metod postępowania:

(I) Stosuje się wzbogacone odżywianie za pomocą pożywki o stężeniu 1,5—3 razy wyższym od stężenia zwykłej pożywki, np. za pomocą pożywki, zawierającej 5% wagowych glikozy i 0,75% wagowego ekstraktu drożdży.

(II) W hodowli w zanurzeniu utrzymuje się atmosferę o zmniejszonym ciśnieniu cząstkowym tlenu. „Zmniejszenie ciśnienia cząstkowego tlenu” uzyskać można uszczelniając naczynie fermentacyjne lub wdmuchując do naczynia gaz obojętny, np. azot lub dwutlenek węgla.

(III) Hodowlę w zanurzeniu prowadzi się w sposób ciągły, zasilając ją dodatkowo ciekłą pożywką.

Dwukariotyczną grzybnie *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. można łatwo przeprowadzić w grzybnie monokariotyczną, stosując wyżej opisane drogi (1)—(3), bez stosowania dodatkowych metod lub w odpowiednim połączeniu z metodami (I)—(III).

Jeśli grzybnia otrzymana w jednym zabiegu hodowlanym prowadzonym sposobem według wynalazku nie jest jeszcze grzybnia całkowicie monokariotyczną, to wówczas stosuje się technikę zwaną „stopniowym przenoszeniem”. Stopniowe przenoszenie polega na tym, że prowadzi się kolejne zabiegi hodowlane, aż do uzyskania breczki hodowlanej, zawierającej grzybnie całkowicie monokariotyczną, przy czym jako hodowlę posiewową w danym zabiegu stosuje się część pełnej breczki hodowlanej, otrzymanej w poprzednim zabiegu. W każdym kolejnym zabiegu hodowla posiewowa zawiera coraz więcej grzybni monokariotycznej i coraz mniejszą ilość grzybni dwukariotycznej.

Stwierdzono, że monokariotyczna grzybnia *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., otrzymywana sposobem według wynalazku, zachowuje zawsze jednakową

postać i właściwości, o ile spełnione są wyżej podane warunki wytwarzania tej grzybni. Oznacza to, że monokariotyczna grzybnia, wytwarzana sposobem według wynalazku, odwarza się jako identyczna monokariotyczna grzybnia w następnym pokoleniu, zachowując właściwości monokariotycznej grzybni, podane w tablicy.

W hodowli na płytce lub w hodowli powierzchniowej (stacjonarnej) monokariotycznej grzybni grzybnia napowietrzna tworzy się z trudnością, lecz powstaje, gdy hodowlę prowadzi się w ciągu kilku miesięcy. Ta napowietrzna grzybnia jest grzybnia dwukariotyczna i gdy zaszczepia się ją w celu wytworzenia owocników, uzyskuje się owocniki właśnie *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., a więc otrzymana grzybnia jest identyczna z grzybnia wyjściową.

Z faktów tych wynika, że monokariotyczna grzybnia *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., wytworzona sposobem według wynalazku, pochodzi od wyjściowej dwukariotycznej grzybni *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel.

Monokariotyczną grzybnia, wytworzona sposobem według wynalazku, jest nową grzybnia, po raz pierwszy otrzymaną sposobem według wynalazku. Została ona nazwana *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. GX-101-3 i złożona do depozytu jako FERM-P nr 3686.

Charakterystyczne właściwości monokariotycznej grzybni *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., wytworzonej sposobem według wynalazku, przedstawiono w tablicy, lecz największe znaczenie tych grzybów dla przemysłu związane jest z dużą prędkością ich rozmnażania. Prędkość ta jest 1,5—10 razy większa od prędkości rozmnażania wyjściowej grzybni dwukariotycznej, a oczywiście tak duża prędkość jest bardzo korzystna w warunkach produkcji przemysłowej.

Monokariotyczną grzybnie, wytworzoną według wynalazku, można stosować do tych samych celów co dwukariotyczną grzybnie *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. Można z niej np. otrzymywać zawierający azot polisacharyd, poddając monokariotyczną grzybnie ekstrakcji zawierającym wodę modium, takim jak woda, rozcieńczony roztwór alkaliczny lub rozcieńczony roztwór kwaśny. Taki zawierający azot polisacharyd można stosować do produkcji leków, np. środka przeciwnowotworowego, środka zwiększającego odporność, środka przeciwwirusowego, środka przeciwgrzybicznego, leku przeciwtętnowego, leku wzmagającego apetyt itp.

Przez niskotemperaturową ekstrakcję monokariotycznej grzybni, wytworzonej sposobem według wynalazku, można otrzymać także różne rodzaje enzymów, np. proteazę, amylazę itp. Co więcej, samą grzybnie lub jej ekstrakty albo pozostałości można stosować do żywności i napojów, jako paszę dla zwierząt i nawóz dla roślin.

Poza wyżej wymienionymi zastosowaniami grzybni, wytworzoną sposobem według wynalazku, można stosować do tych wszystkich celów, do których używa się *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel.

Wynalazek zilustrowano w przykładach, które nie stanowią jednak żadnego ograniczenia zakresu tego wynalazku.

Przykład I. Wytwarzanie monokariotycznej grzybni 100 ml ciekłej pożywki, zawierającej 5% wagowych glikozy i 0,75% wagowego ekstraktu drożdży (produkowanego przez Kyokuto Seiyaku Kogyo Co., Ltd.), odmierza się pipetą do stożkowej kolby o pojemności 500 ml i po dwudziestominutowym wyjaławianiu parą wodną w temperaturze 120°C, pożywkę zaszczepia się 1 ml zawiesiny grzybni, otrzymanej przez zdyspergowanie grzybni *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. Następnie rozpoczyna się hodowlę wstrząsową w temperaturze 25°C, stosując mieszanie z prędkością 200 obrotów/minutę. Grzybnią, z której sporządza się zawiesinę do zaszczepienia pożywki, pochodzi z dwudziestodniowej stacjonarnej hodowli, prowadzonej w temperaturze 25°C, w pożywce, zawierającej 3% wagowe glikozy i 0,5% wagowego ekstraktu drożdży, a przygotowuje się ją drogą rozdrobnienia powłoki grzybniowej w 60 ml fizjologicznego roztworu soli, przy czym rozdrobnienie prowadzi się w ciągu 3 minut za pomocą mieszadła o prędkości obrotowej 6000 obrotów/minutę.

Po upływie 3 dni od momentu rozpoczęcia hodowli, wstrząsową część brzeczek hodowlanej wydobiera się z naczynia fermentacyjnego i zawartą w niej grzybnię obserwuje po zabarwieniu pod mikroskopem. Obserwacja taka wykazała, iż badana grzybnia jest grzybnią dwukariotyczną.

Następnie pełną brzeczkę hodowlaną rozciera się w ciągu 10 minut w mieszalniku homogenizującym (produkcji Sakuma Works), pracującym z prędkością obrotową 10000 obrotów/minutę. Poddaną temu zabiegowi pełną brzeczkę hodowlaną, zawierającą aktywnie rozmnażającą się grzybnię, umieszcza się znowu w kolbie stożkowej o pojemności 500 ml i natychmiast podejmuje hodowlę wstrząsową w podanych powyżej warunkach. Całkowity czas trwania hodowli wynosi 7 dni. Tak wyhodowaną grzybnię nie ma zwartej budowy i tworzy niewielką grzybnię napowietrzną w zwykłym środowisku agaru w hodowli na płycie. Wyniki badań mikroskopowych po zabarwieniu przeprowadzonym niżej podanym sposobem wykazują, iż otrzymana grzybnia jest całkowicie monokariotyczna.

Barwienie. 1 ml brzeczek, zawierającej grzybnię, otrzymaną w wyżej opisany sposób, miesza się z 10 ml wody, a następnie poddaje rozdziałaniu w wirówce w ciągu 5 minut z prędkością 2000—5000 G. Ciecz nad osadu usuwa się, a grzybnię przenosi do probówki, do której dodaje się utrwalający płyn Helly'ego i odstawia na 24 godziny. Oddzielone komórki przemywa się 10 ml wody do odbarwienia, a następnie umieszcza je w 10 ml 1n kwasu solnego, ogrzewa w ciągu 15 minut w temperaturze 60°C, chłodzi do temperatury pokojowej i przemywa 10 ml wody. Następnie zanurza się je w 10 ml wodnego roztworu kwasu azotowego o 20—50 krotnym rozcieńczeniu i przemywa 2—3 razy 10 ml wody.

Otrzymane włókniste komórki rozpościera się na szkiełku przedmiotowym w celu wysuszenia na powietrzu, po czym nanosi się na nie kilka kropli roztworu Giemsa'ego i po upływie 15 minut przemywa ostrożnie wodą i suszy.

Podczas obserwacji komórki o tak zabarwionym

jądrze pod mikroskopem powiększającym 1000-krotnie, każde jądro widoczne jest w postaci okrągłej, zabarwionej na czerwono plamki. Tak więc liczbę jąder można łatwo określić policzwszy okrągłe, zabarwione na czerwono plamki w jednej komórce grzybni. Otrzymana grzybnia nie zakwasza mleczka lakmusowego i nie wykazuje zdolności upłyniania żelatyny.

Rozmnażanie monokariotycznej grzybni.

Słój fermentacyjny o pojemności 20 litrów, zawierający 12 litrów ciekłej pożywki hodowlanej, w której znajduje się 5% wagowych glikozy i 0,75 wagowego ekstraktu drożdży, wyjaławia się parą wodną, po czym pożywkę zaszczepia się przez zmieszanie jej z 1 litrem wodnej zawiesiny monokariotycznej grzybni, otrzymanej w wyżej opisany sposób. Grzybnię hodzi się, doprowadzając do słoja powietrze z prędkością 0,5 litra na 1 litr ciekłej pożywki na 1 minutę i stosując mieszanie z prędkością 550 obrotów/minutę w temperaturze 25±2°C. Bezpośrednio po zaszczepieniu w 1 litrze pożywki hodowlanej znajduje się 0,5 g grzybni (w przeliczeniu na suchą masę).

Dla porównania, w identycznych warunkach prowadzi się hodowlę grzybni dwukariotycznej. Gdy porównano prędkości rozmnażania grzybni monokariotycznej i grzybni dwukariotycznej, biorąc pod uwagę czas potrzebny do uzyskania stężenia grzybni 8 g/litr, stwierdzono, że grzybnia dwukariotyczna osiąga to stężenie w czasie czterokrotnie dłuższym od czasu hodowli grzybni monokariotycznej (fig. 1). Uzyskano również potwierdzenie faktu, że wydajność rozmnażania monokariotycznej grzybni przewyższa o około 20% wydajność rozmnażania grzybni dwukariotycznej.

Przykład II. 100 ml wodnej pożywki hodowlanej, zawierającej 5% wagowych glikozy i 0,75% ekstraktu drożdży, umieszcza się w kolbie stożkowej o pojemności 500 ml i po wyjałowieniu termicznym zaszczepia ją grzybnią za pomocą drutu platynowego zakończonego pętelką, a następnie prowadzi się w ciągu 3 dni hodowlę wstrząsową w temperaturze 25±2°C. Do zaszczepienia stosuje się grzybnię szczepu CM 101 *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., złożoną do depozytu jako FERM-P nr 2412, będącą grzybnią całkowicie dwukariotyczną (fig. 2). Jest to tak zwany pierwszy etap hodowli, a grzybnią otrzymaną w tym etapie ma postać grudkowatą i jest grzybnią całkowicie dwukariotyczną.

Pełną brzeczkę hodowlaną, zawierającą grudkowatą grzybnię, poddaje się w ciągu 5 minut homogenizacji drogą ścinania w mieszalniku homogenizującym (produkcji Sakuma Works), otrzymując brzeczkę pozbawioną grudek. Całą ilość tej zhomogenizowanej pełnej brzeczeki hodowlanej poddaje się dalszej hodowli w temperaturze 25±2°C w ciągu 4 dni. Jest to tak zwany drugi etap hodowli, a grzybnią otrzymaną w tym etapie zawiera jeszcze nieco grudek, jednak obserwacja po zabarwieniu wykazuje, iż przeważająca część grzybni jest grzybnią monokariotyczną. Stężenie całej grzybni w tak otrzymanej pełnej brzeczkę hodowlanej wynosi 11 g/litr brzeczeki.

Dwa powyższe etapy (etap pierwszy i etap drugi)

stanowią tak zwany pierwszy zabieg hodowlany. Pełną brzeczkę hodowlaną otrzymaną w tym zabiegu, zawierającą grzybnie, mającą częściowo postać grudek i składającą się z przeważającej ilości grzybni monokariotycznej i niewielkiej ilości grzybni dwukariotycznej, poddaje się w ciągu 5 minut homogenizacji w mieszalniku homogenizującym, po czym 1 ml tak zhomogenizowanej breczki stosuje się jako hodowlę posiewową w drugim zabiegu hodowlanym.

W pierwszym etapie drugiego zabiegu 100 ml wodnej pożywki hodowlanej, zawierającej 5% wagowych glikozy i 0,75% wagowych ekstraktu drożdży, umieszcza się w stożkowej kolbie o pojemności 500 ml, kolbę i jej zawartość wyjaławia się termicznie, po czym 1 ml tak zhomogenizowanej pełnej breczki hodowlanej, zawierającej przeważającą ilość grzybni monokariotycznej i niewielką ilość grzybni dwukariotycznej, poddaje się w ciągu 3 dni hodowli wstrząsowej w temperaturze $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (drugi etap drugiego zabiegu). Grzybnia, otrzymana w tym etapie, ma wygląd drzewnej papki, a jej obserwacja mikroskopowa po zabarwieniu wykazała, iż jest to grzybnia zasadniczo całkowicie monokariotyczna. Stężenie tej grzybni w pełnej brzeczkce hodowlanej, otrzymanej w drugim zabiegu, wynosi 11 g/litr.

Otrzymaną w drugim zabiegu pełną brzeczkę hodowlaną, zawierającą grzybnie zasadniczo całkowicie monokariotyczną, poddaje się w ciągu 5 minut homogenizacji w mieszalniku homogenizującym i 1 ml tak zhomogenizowanej breczki stosuje się jako hodowlę posiewową w trzecim zabiegu hodowlanym.

W pierwszym etapie trzeciego zabiegu powtarza się tak postępowania, opisany w przypadku pierwszego etapu drugiego zabiegu, z tą różnicą, że hodowlę prowadzi się w ciągu 2 dni. Drugi etap trzeciego zabiegu polega na tym, że pełną brzeczkę hodowlaną, otrzymaną w pierwszym etapie, homogenizuje się w ciągu 5 minut w mieszalniku homogenizującym i poddaje trzydniowej hodowli wstrząsowej w temperaturze $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Grzybnia, otrzymana w tym etapie, ma wygląd drzewnej papki, a jej obserwacja mikroskopowa po zabarwieniu wykazała, iż jest to grzybnia całkowicie monokariotyczna. Stężenie grzybni w pełnej brzeczkce hodowlanej, otrzymanej w drugim etapie trzeciego zabiegu, wynosi 11g/litr.

Otrzymaną w drugim etapie trzeciego zabiegu pełną brzeczkę hodowlaną, zawierającą grzybnie całkowicie monokariotyczną, homogenizuje się w ciągu 5 minut w mieszalniku homogenizującym i 1 ml tak zhomogenizowanej grzybni stosuje się jako hodowlaną posiewową w czwartym zabiegu hodowlanym. Pierwszy etap czwartego zabiegu

prowadzi się w identyczny sposób jak pierwszy etap trzeciego zabiegu, a drugi etap różni się od drugiego etapu trzeciego zabiegu tylko tym, że hodowlę prowadzi się w ciągu 2 dni. Grzybnia w pełnej brzeczkce hodowlanej, otrzymanej w czwartym zabiegu, ma wygląd drzewnej papki i w dalszym ciągu jest grzybnia całkowicie monokariotyczną (nie zaszła przemiana w grzybnie dwukariotyczną). Stężenie grzybni w brzeczkce po czwartym zabiegu wynosi 12g/litr. Oznacza to, że szybkość rozmnażania grzybni monokariotycznej (stężenie 12 g/litr po dwudniowym pierwszym etapie i dwudniowym drugim etapie czwartego zabiegu (jest większa od szybkości rozmnażania grzybni dwukariotycznej (stężenie 11 g/litr po trzydniowym pierwszym etapie i czterodniowym drugim etapie pierwszego zabiegu).

Grzybnia, otrzymana w czwartym zabiegu hodowlanym, nie tworzy grudek i nie zmienia postaci zbliżonej wyglądem do drzewnej papki, w związku z czym w przypadku stosowania jej jako hodowli posiewowej w następnych zabiegach hodowlanych dodatkowa homogenizacja jest zbędna.

Obserwowana pod mikroskopem komórka grzyba nie ma budowy spistej, stwierdzonej u zwykłej grzybni dwukariotycznej i jest około dwukrotnie szersza od tej grzybni. Z przeprowadzonych metodą z przykładu I pomiarów liczby jąder wynika, że otrzymane komórki są komórkami grzybni całkowicie monokariotycznej, co przedstawiono na mikrofotografii na fig. 3.

Gdy hodowlę grzybni kontynuuje się w identycznych warunkach jak w poprzednim zabiegu hodowlanym, z monokariotycznej grzybni powstaje grzybnia rozmnożona, wykazująca wszystkie właściwości identyczne z właściwościami monokariotycznej grzybni, przedstawionymi w tablicy. Stwierdzono również, że prędkość rozmnażania monokariotycznej grzybni jest ponad dwukrotnie wyższa niż w przypadku grzybni dwukariotycznej.

10 g wysuszonej monokariotycznej grzybni, otrzymanej podanym wyżej sposobem, ekstrahuje się 300 ml gorącej wody w temperaturze $95-100^\circ\text{C}$ w ciągu 3 godzin. Ekstrakt zateża się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 30°C , a następnie miesza z metanolem. Wytrącony osad odsącza się i suszy, otrzymując 0,2 g proszku o szarej barwie. Chemiczna analiza tego proszku wykazała, iż jest to zawierający azot polisacharyd o dużym ciężarze cząsteczkowym. Polisacharyd ten podany myszy zaszczepionej mięsakiem typu 180 wykazał wysoką czynność przeciwnowotworową.

Przykład III. 100 ml ciekłej pożywki, zawierającej 5% wagowych glikozy i 0,75% wagowego ekstraktu drożdży, umieszcza się w stożkowej kolbie o pojemności 500 ml, zawierającej 8 g szklanych kulek o średnicy 2—5 mm i po wyjałowieniu termicznym zaszczepia się pożywkę dwukariotyczną grzybnie *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., identyczną jak w przykładzie I. Zaszczepianie prowadzi się za pomocą platynowego drutu zakończonych pętelką, a zaszczepioną pożywkę poddaje się w ciągu 7 dni hodowli wstrząsowej w temperaturze $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Stężenie rozmnożonej grzybni w pełnej brzeczkce hodowlanej wynosi 11,3 g/litr, a mikroskopowa

obserwacja zabarwionych komórek grzybowych wykazała, iż jest to grzybnia, zawierająca przeważającą ilość grzybni monokariotycznej i niewielką ilość grzybni dwukariotycznej. 1 ml tak otrzymanej pełnej brzeczki hodowlanej zaszczepia się 100 ml pożywki o wyżej podanym składzie i prowadzi hodowlę wstrząsową w kolbie, zawierającej szklane kulki w ciągu 6 dni w temperaturze $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Otrzymana grzybnia nie miała zwartej budowy właściwej dla grzybni dwukariotycznej, a jej szerokość była półtorakrotnie większa od szerokości grzybni dwukariotycznej. Obserwacja mikroskopowa zabarwionej grzybni potwierdziła, że jest to grzybnia monokariotyczna. 1 ml otrzymanej pełnej brzeczki hodowlanej, zaszczepia się 100 ml pożywki o wyżej podanym składzie i prowadzi hodowlę wstrząsową w kolbie o pojemności 500 ml, zawierającej szklane kulki w ciągu 5 dni w temperaturze $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Tak otrzymana grzybnia nie ma spójnej budowy, a obserwacja mikroskopowa po zabarwieniu wykazała, że jest to grzybnia monokariotyczna.

1 ml otrzymanej pełnej brzeczki hodowlanej zaszczepia się 100 ml ciekłej pożywki, zawierającej 5% wagowych glikozy i 0,75% wagowego ekstraktu drożdży. Hodowlę wstrząsową prowadzi się w ciągu 4 dni w kolbie o pojemności 500 ml, nie zawierającej żadnych stałych ziarnistych materiałów, w temperaturze $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Stężenie otrzymanej grzybni wynosi 10,5 g/litr brzeczki, a obserwacja mikroskopowa po zabarwieniu potwierdza, że jest to grzybnia całkowicie monokariotyczna.

Gdy hodowli wstrząsowej, prowadzonej w ciągu 4 dni, od początku bez użycia szklanych kulek, poddaje się identyczną jak powyżej ilość zwykłej dwukariotycznej grzybni *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. (złożonej do depozytu jako FERM-P nr 2412), stosując pożywkę, zawierającą 5% glikozy i 0,75% wagowego ekstraktu drożdży, to otrzymana grzybnia jest grzybnia również dwukariotyczna, a jej stężenie w brzeczce hodowlanej wynosi około 7 g/litr. Jest więc oczywiste, iż zdolność rozmnażania się grzybni monokariotycznej jest znacznie większa niż grzybni dwukariotycznej.

Przykład IV. 100 ml ciekłej pożywki, zawierającej 5% wagowych glikozy i 0,75% wagowego ekstraktu z drożdży, umieszcza się w kolbie stożkowej o pojemności 500 ml i po wyjałowieniu zaszczepia pożywkę grzybnia dwukariotyczną *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. (szczep CM-101, złożony do depozytu jako FERM-P nr 2412). Hodowlę wstrząsową prowadzi się w ciągu 3 dni w temperaturze $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, po czym pełną brzeczkę hodowlaną poddaje się w ciągu 5 minut homogenizacji w mieszalniku homogenizującym (produkcji Sakuma Works) z prędkością obrotową 10000 obrotów/minutę. Zhomogenizowaną pełną brzeczkę hodowlaną umieszcza się ponownie w kolbie stożkowej o pojemności 500 ml, po czym kolbę umieszcza się w torbie polietylenowej i uszczelnia torbę tak, by do kolby nie dostawało się powietrze z zewnątrz. Hodowlę prowadzi się w temperaturze $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ w ciągu 4 dni, po upływie których w powietrzu, znajdującym się w torbie, stężenie CO_2 wynosi 5% objętościowych.

1 ml pełnej brzeczki hodowlanej, otrzymanej w tej hodowli, zaszczepia się 100 ml ciekłej pożywki o składzie identycznym jak w pierwszym zabiegu i hodowlę wstrząsową prowadzi się w temperaturze $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ w ciągu 4 dni. Następnie pełną brzeczkę hodowlaną homogenizuje się w ciągu 5 minut w mieszalniku homogenizującym z prędkością obrotową 10000 obrotów/minutę. Tak zhomogenizowaną pełną brzeczkę hodowlaną umieszcza się znowu w kolbie stożkowej o pojemności 500 ml i po umieszczeniu kolby w torbie polietylenowej podejmuje się hodowlę wstrząsową, trwającą 4 dni w temperaturze $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Trzeci i czwarty zabieg hodowlany prowadzi się w identyczny sposób, przy czym jako hodowle posiewowe stosuje się pełne brzeczki hodowlane, otrzymane odpowiednio w drugim i trzecim zabiegu. Po zakończeniu czwartego zabiegu obserwacja mikroskopowa zabarwionej grzybni wykazuje, iż jest to grzybnia monokariotyczna. Prawdopodobnie ze względu na odizolowanie hodowli od otoczenia w drugim etapie poszczególnych zabiegów rozmnażanie grzybni jest nieco zahamowane, toteż stężenie grzybni po każdym zabiegu wynosi 6–7 g/litr brzeczki.

Przykład V. 100 ml ciekłej pożywki, zawierającej 5% wagowych glikozy i 0,75% wagowego ekstraktu drożdżowego, umieszcza się w stożkowej kolbie o pojemności 500 ml i po wyjałowieniu termicznym zaszczepia pożywkę grzybnia, otrzymaną ze skosu kultury *Coliorus versicolor* (Fr.) Quel. (szczep CM-103 złożony do depozytu jako FERM-P nr 2414) (fig. 4). Hodowlę wstrząsową w temperaturze $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ prowadzi się w ciągu 7 dni, otrzymując rozmnożoną grzybnia dwukariotyczną o stężeniu 10,8 g/litr brzeczki.

Tak otrzymaną grzybnia dwukariotyczną zaszczepia się 20 litrów ciekłej pożywki, zawierającej 10% wagowych glikozy i 1,5% wagowego ekstraktu drożdży, stosując 0,01% wagowo-objętościowego grzybni (w przeliczeniu na suchą masę). Hodowlę w zanurzeniu w naczyniu fermentacyjnym, w którym temperatura wynosi $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, prowadzi się stosując mieszanie za pomocą mieszadła łopatkowego o prędkości obrotowej 500 obrotów/minutę. Po 7 dniach hodowli stężenie grzybni w brzeczce wynosi 10,2 g/litr, a obserwacja mikroskopowa po zabarwieniu wykazuje, że grzybnia składa się w przeważającej części z grzybni monokariotycznej, a w niewielkiej części z grzybni dwukariotycznej. 20 ml tak otrzymanej pełnej brzeczki hodowlanej zaszczepia się 20 litrów ciekłej pożywki, zawierającej 5% wagowych glikozy i 1,5% wagowego ekstraktu drożdży i drugi zabieg hodowlany prowadzi się w naczyniu fermentacyjnym, wyposażonym w mieszadło o prędkości obrotowej 500 obrotów/minutę, w temperaturze $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, w ciągu 8 dni.

Grzybnia, otrzymana w drugim zabiegu, zawiera jedynie nieznaczną ilość grzybni dwukariotycznej i składa się niemal wyłącznie z grzybni monokariotycznej. Trzeci i czwarty zabieg prowadzi się w identycznych warunkach w ciągu odpowiednio 5 i 4 dni, stosując do zaszczepiania 20 ml pełnej brzeczki hodowlanej, otrzymanej odpowiednio w drugim i trzecim zabiegu. Obserwacja mikroskopowa zabarwionej grzybni z trzeciego zabiegu

wykazała jedynie minimalną ilość grzybni dwukariotycznej, podczas gdy w grzybni z czwartego zabiegu nie wykryto jej wcale. Grzybnia z czwartego zabiegu miała wygląd papki drzewnej, a jej stężenie wynosiło 11,5 g/litr brzezki.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowej monokariotycznej grzybni *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., **znamienny tym**, że pełną brzezkę hodowlaną, zawierającą aktywnie rozmnażającą się dwukariotyczną grzybnie *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel, 5—10% wagowych glikozy i 0,5—0,75% wagowego ekstraktu drożdży, poddaje się w trakcie hodowli obróbce mechanicznej drogą ścinania lub rozcierania, przy czym obróbkę mechaniczną, mającą charakter ciągły lub okresowy, prowadzi się co najmniej raz w czasie trwania całego procesu hodowli, wewnątrz lub na zewnątrz naczynia fermentacyjnego.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się obróbkę mechaniczną w homogenizatorze.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się obróbkę mechaniczną za pomocą mieszadła.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się obróbkę we wstrząsowym naczyniu fermentacyjnym za pomocą obojętnych stałych ziarnistych materiałów.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że jako obojętne stałe ziarniste materiały stosuje się szklane kulki.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę w zanurzeniu prowadzi się przy intensywnym odżywianiu za pomocą ciekłej pożywki o dużym stężeniu substancji odżywczych.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę w zanurzeniu prowadzi się metodą ciągłą, zasilać hodowlę dodatkowo ciekłą pożywką.

8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę w zanurzeniu prowadzi się w naczyniu odizolowanym od otoczenia lub przepuszczając przez naczynie obojętny gaz.

9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się, stosując kolejne zabiegi hodowlane do momentu otrzymania pełnej brzezki hodowlanej, zawierającej grzybnie całkowicie monokariotyczną, przy czym w każdym z kolejnych zabiegów jako hodowlę posiewową stosuje się część pełnej brzezki hodowlanej, otrzymanej w poprzednim zabiegu i zawierającej grzybnie monokariotyczną i grzybnie dwukariotyczną.

FIG.1

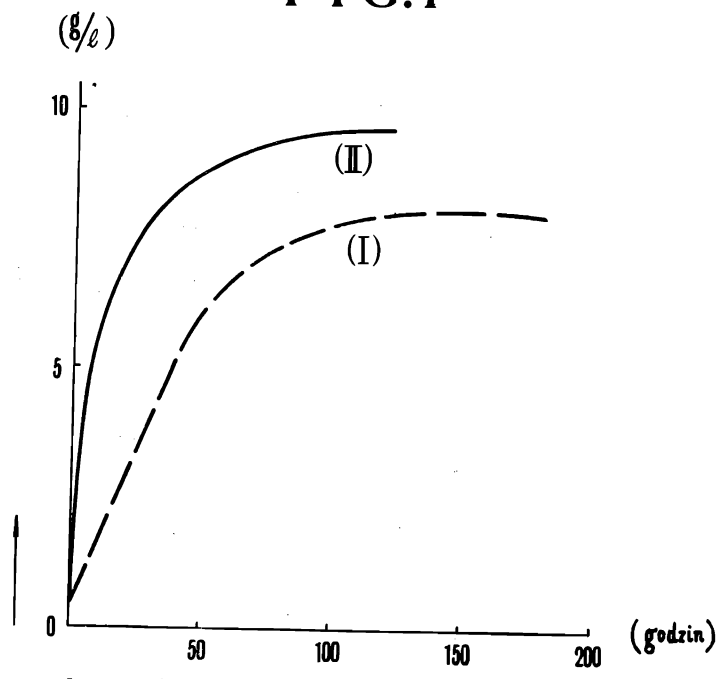


FIG.2

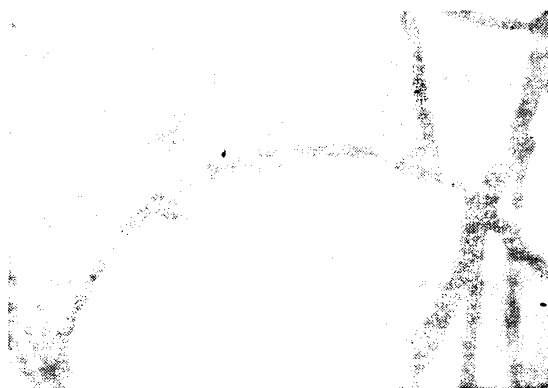


FIG.3

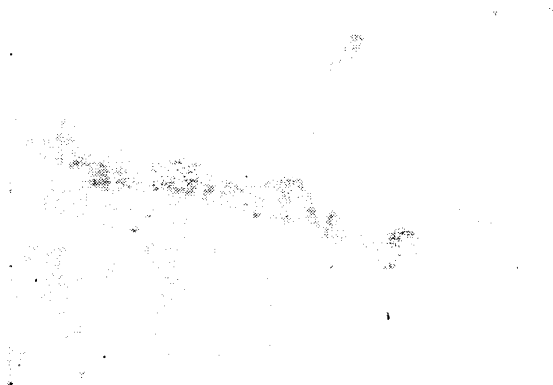
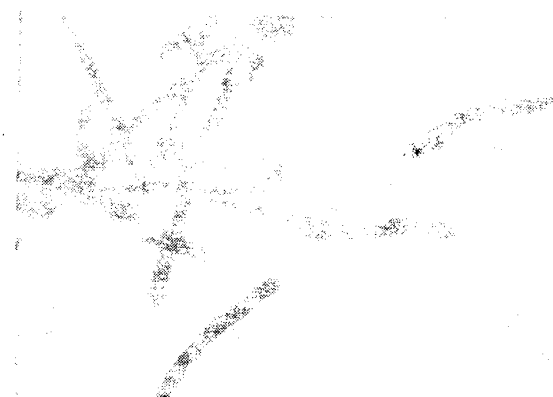


FIG.4



OZGraf. Z.P. Dz-wo, z. 1137 (160-20) 2.80

Cena 45 zł