



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

219189

(11)

(B1)

(22) Prihlášené 27 07 81
(21) (PV 5703-81)

(40) Zverejnené 30 07 82

(45) Vydané 01 06 85

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/04

(75)

Autor vynálezu

FUSKA JÁN ing. CSc., FUSKOVÁ ALŽBETA ing., BRATISLAVA,
JÍLEK RUDOLF ing. CSc., BRNO, KHANDLOVÁ ALŽBETA, JUR PRI
BRATISLAVE

(54) Spôsob konzervácie bazídiomycéty *Coprinus* sp., schopnej degradácie celuló- zových substrátov

Vynález spadá do odboru technickej mikrobiológie. Rieši spôsob uchovávaní a použitia konzervovanej bazídiomycéty *Coprinus* sp., schopnej degradácie celulózových substrátov. Pestuje sa tak, že na sklenené guľôčky sa naleje roztok sladinky o hodnote pH 6,5 a po sterilizácii sa pôda naočkuje bazídiomycétou *Coprinus* sp. a kultivuje sa 5 až 10 dní pri teplote 28 až 35 °C, s výhodou 32 °C. Potom sa povrch kultúry preleje roztokom maltózy v množstve 2,5 ml na 10 cm² povrchu. Potom sa mycélium mechanicky rozdrví a vytvorená suspenzia sa ampulkuje po 2 ml, zátkuje a vkladá do mraziaceho kúpeľa na 10 až 30 minút pri teplote -50 až -70 °C a voda sa z kultúr pri tlaku 10⁻¹ Pa odsublimuje počas 12 až 24 hodín. Ampulky sa ďalej ihneď zatavia.

Vynález sa týka spôsobu konzervácie bazídiomycéty kmeňov *Coprinus* sp., a jej mutantov vo forme výtrusov a fragmentov hýf pri veľmi nízkej vlhkosti.

Kmene bazídiomycét sa najčastejšie uchovávajú vo forme výtrusov alebo pravidelným pasážovaním kultúr na vhodných živných agarových médiách. Uchovávanie vo forme výtrusov je vhodné predovšetkým na udržiavanie zbierkových kmeňov. Pri tomto postupe je potrebné kmene kultivovať za takých podmienok, aby došlo k vytváraniu plodničiek, čo je technicky náročné a obyčajne vyžaduje i špeciálne kultivačné postupy. Viabilita výtrusov *Coprinus* sp. je iba niekoľko %, pričom výtrusy v tej istej plodničke sa od seba odlišujú aj geneticky.

Uschovanie popísaným spôsobom je preto náročné a nie veľmi spoľahlivé, pričom pri použití takéhoto uschovávania pracujeme v ďalšom technologickom procese s materiálom geneticky značne heterogénnym.

Keďže mnohé mutanty získané šľachtením len veľmi ťažko tvoria výtrusy, prípadne túto schopnosť stratili úplne, je nutné takéto kmene uchovávať ich pravidelným pasážovaním cez živné agarové médiá a ukladať ich po vyrastení pri teplote cca $+4^{\circ}\text{C}$. Dochádza tak k značnému riziku, že postupným pasážovaním sa vlastnosti vyšľachtených kmeňov menia, prípadne sa kultúry postupne obohacujú takým fenotypom, pre ktorý sú použité podmienky pasážovania optimálne.

Tieto nevýhody sú odstránené u spôsobu uschovávania bazídiomycéty *Coprinus* sp., schopnej degradácie celulózových substrátov podľa vynálezu, ktorého podstatou je, že sa na sklenené guľičky priemeru 3 až 0 mm naleje roztok sladinky o hodnote pH 6,5 v takom objeme, aby jeho hladina neprevyšovala povrch guľičiek a po sterilizácii sa pôda naočkuje bazídiomycétou *Coprinus* sp., a kultivuje 5 až 10 dní pri teplote 28 až 35°C , s výhodou 32°C . Potom sa povrch vyrastenej kultúry preleje sterilným, 3 až 5 % hmotnostným roztokom maltózy v množstve 2,5 ml na 10 cm^2 povrchu. Ďalej sa mycélium mechanicky rozdrví a vytvorená suspenzia sa ampulkuje po 2 ml a prikryje vatovou zátkou a vkladá sa do mraziaceho kúpeľa na 10 až 30 minút pri teplote -50 až -70°C a voda z kultúr sa pri tlaku 10^{-1} Pa odsublmuje za 12 až 24 hodín a ampulované vzorky s vysušenou kultúrou sa okamžite zatavia a uložia pri bežnej laboratórnej teplote.

Postup je založený na okamžitom prevedení vody, prítomnej v bunkách kultúry, do pevnej formy pri veľmi nízkych teplotách tak, aby nedošlo k poškodeniu membrány bunky. Potom sa voda za nízkeho tlaku odstráni tak, aby nedošlo k jej prechodu do tekutej fázy. Keďže takýmto spôsobom sa môžu uchovávať aj kmene vo forme fragmentov hýf, oidíí alebo chlamydospór, vyhovuje tento postup aj pre tie kmene, ktoré netvoria plodničky alebo ich spolu s výtrusmi tvoria len veľmi zriedkavo.

Pre tento účel sa vypracoval kultivačný postup, ktorý umožnil kultivovať kmene tak, aby vytvárali maximum vzdušného mycélia, čo umožňuje kultivácia na pevných inertných nosičoch. Ak sa vhodným spôsobom monokolónia *Coprinus* sp. kultivuje staticky určitú dobu, vytvorí podhubie a množstvo vzdušných hýf, prípadne oidíí a chlamydospór. Po mechanickom zhomogenizovaní podhubia i vláknien možno pripraviť podľa veľkosti porastenej plochy až 25 kusov konzerv takmer rovnakej kvality. Kmeňový materiál z konzervy možno bezprostredne previesť už po krátkom čase do vegetatívnej formy a kedykoľvek použiť vo výrobe. Štandardizáciou inokulačného materiálu sa navyše významne stabilizuje celý výrobný proces.

Príprava konzerv kmeňov *Coprinus* takýmto spôsobom a použitie zakonzervovaných kmeňov je uvedené v nasledujúcich príkladoch.

Príklad 1

Plodnička bazídiomycéty *Coprinus* sp. sa preniesie do malej E-baňky, preleje sa 2–4 ml 5 % roztoku maltózy, ktorý obsahuje 100 mg/ml penicilínu a C a 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycín sulfátu. Plodnička sa mechanicky rozruší a uvoľnené výtrusy sa filtráciou cez tenkú vrstvu vaty zbavia fragmentov plodničiek a suspenzia výtrusov obsahu 2 ml sa preniesie do tenkostennej sterilnej ampule o objeme 20 ml. Ampule so suspenziou výtrusov sa vložia na 20 minút do mraziaceho kúpeľa o teplote -40 až -70°C a potom sa sublimáciou pri tlaku 10^{-1} Pa zbavia vody. Po vysušení sa ampule okamžite zatavia. Vlhkosť obsahu sa pohybuje cca 0,1–0,2 %.

Príklad 2

Kultivačná pôda, ktorou je 3 % sladinkový agar o pH 6,5 sa naočkuje hýfami bazídiomycéty *Coprinus* sp. a ponechá sa kultivovať 5 až 10 dní pri teplote 28°C . Povrch vyrastenej kultúry sa preleje sterilným 5 % roztokom maltózy o obsahu 3 ml na 12 cm^2 povrchu agaru a pomocou drôteného očka alebo sklenej tyčinky sa zoškrabú vzdušné vlákna vyrastené na povrchu agaru. Pripravená suspenzia hýf a ich fragmentov, sa sterilným spôsobom rozplní po 2 ml do 20 ml tenkostenných ampúl, používaných pre prípravu injekčných roztokov. Ampule sa prekryjú vatovou zátkou a vložia do mraziaceho kúpeľa na 10 až 20 minút pri teplote -50 až -70°C a po zmrazení sa voda v priebehu 10–20 hodín odsublmuje pri tlaku 10^{-1} Pa . Po vysušení sa ampule okamžite zatavia a uložia pri laboratórnej teplote.

Príklad 3

Do 250 ml E-baňky, ktorej dno je pokryté sklenenými guľičkami priemeru 3–6 mm sa pridá 10 ml 3 % sterilnej sladinky a po sterilizácii sa na povrchu guľičiek položí agarový bloček približnej veľkosti 1 cm^2 vyrastenej kultúry *Coprinus* sp. Kultivuje sa 5 až 7 dní pri teplote 28 až 32°C . Ku kultúre, vyrastenej po celom povrchu, sa pridá

10 ml 5 % roztoku maltózy, kultúra sa mechanicky dôkladne zhomogenizuje a rozplní sa po 2 ml do 20 ml tenkostenných ampúl prekrytých vatovou zátkou. Po bezprostrednom zmrazení počas 15 až 30 min., pri -50 až -70 °C sa pri tlaku 10^{-1} Pa kultúra zbaví vody a ampule sa za bežného tlaku zatavia.

Príklad 4

Do Rouxovej fľaše o objeme 1000 ml sa vsypú sklenené guľičky v takom množstve, aby pokrývali celú plochu 200 cm^2 . Po pridaní 50 až 60 ml 3 % roztoku sladinky o hodnote pH 6,5 sa pôda vysterylizuje a po ochladení sa naočkuje vodnou suspenziou vlákien, prípadne ich fragmentov, bazídiomycéty *Coprinus* sp. Po 7 až 10-dňovej kultivácii pri teplote $28-32$ °C sa celý povrch tvorený guľičkami pokryje súvislou vrstvou mycélie. Pridá sa 40 až 60 ml 5 % sterilného roztoku maltózy a mechanickým pohybom sa pripraví suspenzia hýf a ich fragmentov kultúry *Coprinus* sp., ktorá sa po 2 ml rozplní do 20 ml tenkostenných ampúl. Po prekrytí vatovou zátkou sa obsah ampúl okamžite zmrazí počas 15 až 30 minút, pri -50 až -70 °C a pri tlaku 10^{-1} Pa sa sublimáciou zbaví vody. Ampule sa zatavia pri normálnom atmosferickom tlaku. Celkom sa z jednej Rouxovej fľaše pripraví 20 až 25 konzerv, ktoré obsahujú kultúru *Coprinus* sp. rovnakej kvality.

Príklad 5

V Rouxových fľašiach o objeme 1000 ml sa pripraví kultúra *Coprinus* sp. postupom popísaným v príklade 4. Po ukončenej kultivácii sa pripraví suspenzia hýf a ich fragmentov, ktoré sa už uvedeným spôsobom prevedú do formy lyofilizovaných konzerv. Zbytok hýf a ich fragmentov približne 10 ml objemu, ktoré ostali zachytené medzi nosným materiálom, sa znovu preleje sterilným roztokom 3 % sladinky o hodnote pH 6,5, dôkladne sa obsah Rouxovej fľaše premieša a ponechá sa opäť kultivovať, ale kratší čas, a to 4 až

5 dní pri $28-32$ °C. Po pridaní sterilného roztoku 5 %-ného roztoku maltózy sa suspenzia fragmentov a celých hýf kultúry *Coprinus* sp. použije na prípravu lyofilizovaných konzerv alebo sa priamo využije na prípravu vegetatívneho inokula II. stupňa.

Príklad 6

Ampula, obsahujúca 2 ml lyofilizovanej kultúry *Coprinus* sp., sa sterilným spôsobom otvorí, pridá sa 2 ml kultivačného média a v priebehu 2–3 min. sa pripraví suspenzia kultúry, ktorá sa sterilne preleje do 500 ml banky, obsahujúcej 100 ml média nasledujúceho zloženia: glukóza 3 g, močovina 0,07 g, kukuričný výluh s obsahom 50 % sušiny 1,0 g, KH_2PO_4 0,1 g, KCl 0,05 g MgSO_4 0,001 g, doplní sa vodou do 100 ml a pH sa upraví na 6,5. Kultivuje sa pri 28 °C na rotačnej trepačke 220 ot. min.^{-1} po dobu 72 až 96 hodín. Takto pripravené inokulum sa použije na očkovanie pôdy rovnakého zloženia ako pri príprave inokula. Získa sa 8–12 g sušiny s obsahom 24–36 % dusíkatých látok. Výsledky sú rovnaké ako pri použití nalyofilizovanej kultúry *Coprinus* sp.

Príklad 7

Inokulom pripraveným z lyofilizovanej kultúry *Coprinus* sp. ako je uvedené v príklade 6 sa očkuje celulóзовý substrát, ktorou je slamová drž s obsahom 70–80 % vlhkosti, do ktorého boli pridané na hmotnosť 1 kg nasledujúce živiny: močovina 32 g, K_2HPO_4 1,6 g. Substrát sa uloží do hliníkových alebo umelohmotových plytkých nádob veľkosti $100 \times 120\text{ cm}$ v hrúbke vrstvy 4–8 cm. Po sparení sa substrát naočkuje vegetatívnym inokulom II. stupňa a to 60 až 100 ml na 1 kg substrátu a ponechá sa kultivovať 7–12 dní pri teplote 32 ± 2 °C, pri relatívnej vlhkosti ovzdušia v kultivačnom priestore 60–98 %. Po ukončenej kultivácii obsahuje substrát 20 % dusíkatých látok.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob konzervácie bazídiomycéty *Coprinus* sp., schopnej degradácie celulóзовých substrátov vyznačený tým, že na sklenené guľičky priemeru 3 až 6 mm sa naleje roztok sladinky o hodnote pH 6,5 v takom objeme, aby jeho hladina neprevyšovala povrch guľičiek a po sterilizácii sa pôda naočkuje bazídiomycétou *Coprinus* sp. a kultivuje sa 5 až 10 dní pri teplote 28 až 35 °C, s výhodou 32 °C, ďalej sa povrch vyrastenej kultúry preleje sterilným 3 až 5 % hmotnostným roztokom maltó-

zy v množstve 2,5 ml na 10 cm^2 povrchu, potom sa mycélium mechanicky rozdrť a vytvorená suspenzia fragmentov hýf, oidií a chlamydospor sa ampulkuje po 2 ml a prikryje vatovou zátkou a vkladá sa do mraziaceho kúpeľa na 10 až 30 minút pri teplote -50 až -70 °C a voda z kultúr sa pri tlaku 10^{-1} Pa odsublikuje za 12 až 24 hodín a ampulované vzorky s vysušenou kultúrou sa okamžite zatavia a uložia pri laboratórnej teplote.