



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

209783

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 15/00

/22/ Prihlášené 18 10 79
/21/ /PV 7070-79/

(40) Zverejnené 27 02 81

(45) Vydané 15 02 83

(75)
Autor vynálezu

FUSKA JÁN doc. ing. CSc., BRATISLAVA, JÍLEK RUDOLF ing. CSc.,
PAVLÍKOVÁ EVA RNDr., BRNO, RŮŽIČKOVÁ VLADISLAVA RNDr., VOJKOVICE,
ZEZULA VLASTIMIL RNDr., VELKÁ BÍTEŠ a VODIČKOVÁ MAGDA prom. biol.,
BRNO

(54) Spôsob šľachtenia kmeňov *Coprinus* sp.

1

Vynález sa týka spôsobu šľachtenia kmeňov bazidiomycety *Coprinus* sp., schopných degradovať celulózu prítomnú v slamovom substráte, pri súčasnom zvýšení obsahu dusíkatých látok a voľnej glukózy v kultivovanom substráte.

Pôvodný kmeň *Coprinus* sp. izolovaný z jáchymovských baní rástol na slamovom substráte len veľmi pomaly a po 12 až 14 dňoch povrchnej aktivácie sa zvýšil obsah celkových dusíkatých látok, vyjadrený ako celkový dusík x 6,25, z 2 až 3 % na 12 až 14 %, pričom konečný substrát obsahoval iba stopy monosacharidov. Kŕmne pokusy s takto získaným substrátom stimulovali rast kŕmených zvierat, ak boli použité ako doplnok dusíkatých látok do tradičných krmív. Pasívnym výberom spontánne sa tvoriacich variant *Coprinus* sp. nie je možné dosiahnuť ekonomicky výhodný, t. j. 18 až 20 % dusíkatých látok obsahujúci slamový substrát, pripravený priemyselným postupom.

Na aktívne šľachtenie bolo použité, najmä pri kmeňoch rodu *Penicillium* /M. P. Backus, J. F. Stauffer, Mycologia, 47, 446, 1955; J. Fuska, E. Welwardová: Biológia 24, 691, 1969/ a rodu *Cephalosporium* /R. P. Elander: Microbiologia s. 517, 1976/ UV žiarenie o vlnovej dĺžke 2530 Å. Výtrusy kmeňa *Coprinus* sp. ako iné bazidiomycety boli na pôsobenie UV - žiarenia aj rtg-lúčov pomerne vysoko odolné /M. Semerdžieva, M. Blumaverová: Studia Biophys, 36/37, 183, 1973/. Lepší efekt v tvorbe mutant sa dosiahol pri nami aplikovaných mutagénach, ktoré reagujú s celulárnou desoxyribonukleínovou ako alkylačné činidlá, zabraňujú replikácii desoxyribonukleínovej kyseliny, ktorá zároveň nemôže slúžiť ako matrica pre syntézu ribonukleínovej kyseliny. Takto sa aplikoval tris/3-chloretylamín/hydrochlorid a mutagén TS 160, ktorý v spojení s prídávaním látok, ktoré reagujú s thiolovými skupinami, blokujúcimi SH-enzýmy ako je napríklad jedacetamid zvýšil mutagénny efekt, vyvolaný účinkom žiarenia a alkylačných činidiel /E. J. Grajevskij, A. G. Tarasenko; Radiologija 6, 983, 1972/. Táto skutočnosť je uvedená v tabuľke 1.

T a b u l k a 1

	Prežívanie spôr / % /	Mutanty s prod. N-látok nad 120 % kontroly / % /
Kontrola	100	-
Jódacetamid /0,1 mM/	85	-
TS 160 /0,004M/	70	1,96
Jódacetamid /0,1 mM/ TS 160 /0,004M/	55	13,76

Uvedené nedostatky odstraňuje spôsob šľachtenie bazidiomycety *Coprinus* sp., ktorého podstatu spočíva v tom, že na spóry kmeňa sa pôsobí mutagénymi látkami, reagujúcimi s jeho desoxyribonukleínovou kyselinou v zmysle alkylačných reakcií, ako sú 0,005 až 0,04 M bis/beta-chloretoamín/hydrochlorid alebo 0,005 až 0,04 M N-yperit, a látkami blokujúcimi SH-skupiny ako sú 0,005 až 0,01 mM jódacetami alebo N-etylmaleimid, po dobu 10 až 30 minút, ďalej sa alikvótny podiel spórovej suspenzie riedi 1%-ným roztokom glycerínu a vyseje sa na povrch agarovej platne a po vyrastení sa kultivuje na slamovom substráte.

Takto sa získa kmeň bazidiomycety *Coprinus* sp. C₂₀, CCMF-674, so zvýšenou produkciou dusíkatých látok za súčasného obohatenia kultivovaného slamového substrátu monosacharidmi. Ďalej sa môže kmeň bazidiomycety *Coprinus* sp. C₂₀-CCMF-674 kultivovať v slamovom substráte, upravenom prídavkom látok obsahujúcich dusík, draslík a fosfor, ako sú močovina a draselné soli kyseliny fosforečnej a kultiváciou pri teplote 28 až 36 °C, pri vysokej vlhkosti vzduchu, čím sa získa kmeň s vyšším podielom dusíkatých látok a monosacharidov v slamovom substráte.

Výhodou tohoto postupu je, že sa jednak zvýši variačné rozpätie u získaných mutant /zo 140 až 170 % N-látok oproti kontrole/ a tiež počet mutant schopných zvýšenej produkcie celkového obsahu N-látok nad 120 % vzhľadom ku kontrole v kultivačnom substráte, oproti kontrolnému kmeňu. Nové kmene získané týmto postupom okrem zvýšenia obsahu celkových N-látok ponechávajú pri kultivačnom procese časť biotransformovanej celulózy vo forme monosacharidov, prevažne glukózy, tak ako je to uvedené v tabuľke 2.

T a b u l k a 2

Kmeň	Obsah N-látok v substráte		Koncentrácia redukujúcich cukrov v substráte / % /
	%	% zvýšenia voči pôvodnému obsahu	
<i>Coprinus</i> sp. pôvodný	12-14	-	2 - 3
<i>Coprinus</i> sp. C ₂₀ , CCMF-674	-21-	64	4 - 6
<i>Coprinus</i> sp. C ₂₀ , podľa pokusu 3	18-19	28 až 35	3 - 5

Monosacharidy sú pre metabolické procesy zvierat ľahko dostupné, čím sa zvyšuje energetický účinok kultivovaného substrátu. Po kultivácii substrátu použitými kmeňmi *Coprinus* sp. nedochádzalo k produkcii látok s potenciálnymi mutagénymi prípadne kancerogénymi účinkami ako bolo dokázané testami podľa Ames /B. N. Ames, J. Mc. Cann, E. Yamasaki: Mutation Res., 31, 347, 1975/. V pokusoch in vivo sa neprojavili u pokusných zvierat žiadne negatívne príznaky po podávaní obohateného substrátu.

Uvedeným spôsobom sa celý postup biotransformácie celulózy a jej využitia stáva výrazne ekonomickejši a atraktívnejší z hľadiska využitia. Týmto postupom boli získané kmene *Copri-*

nus sp. C_{20} , CCCF-674, ktoré pri overení v prevádzkovom merítke vytvárali priemerne 18 až 21 % N-látok v substráte, čo je 28 až 64 % zvýšenie oproti kontrolnému kmeňu.

Príprava kmeňov týmto postupom a overenie ich vlastností sú uvedené v príkladoch.

P r í k l a d 1

Spóry kmeňa *Coprinus* sp. boli suspendované vo vode a filtráciou cez vrstvu vaty boli zbavené zhlukov spór a fragmentov vegetatívneho mycélia, pričom počet spór bol $3 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. K suspenzii spór bol sterilným spôsobom pridaný roztok mutagénu tris/beta-chloretylamín/. HCl v takom množstve, aby jeho výsledná koncentrácia v roztoku bola 0,008 M. Pripravená spórová suspenzia bola sterilným spôsobom zmiešaná v pomere 1:1 s vodným roztokom jodacetamidu o koncentrácii 0,2 mM. Po 20 min. pôsobení mutagénu za neustáleho miešania bol alikvotný podiel spórovej suspenzie odobratý a prenesený do 1 % roztoku glycínu. Spórová suspenzia bola ďalej riedená a spóry vysiate na povrch sladínového agaru, a to 0,1 ml spór na povrch agarovej platne o priemere 10 cm. Po 48 až 72 hod. kultivácii pri 34°C sa vyrastené monokolónie preniesli na šikmý sladínový agar a postupne boli hodnotené submerznou i povrchovou kultiváciou na slamovom substráte. Kmeň *Coprinus* C_{20} pri hodnotení v prevádzkovom merítke, po 12 dňoch kultivácie, poskytol produkt, ktorý obsahoval až 21 % N-látok na gram sušiny.

P r í k l a d 2

Spóry kmeňa *Coprinus* sp. suspendované vo vode sa zbavili filtráciou fragmentov mycélia a zmiešali sa s roztokom mutagénu tris/beta-chloretylamín/. HCl v takom pomere, aby výsledná koncentrácia mutagénu bola 0,008 M. Pripravená spórová suspenzia sa v pomere 1:1 zmiešala s 0,01 M vodným roztokom N-etylmaleimidu. Po 20 min. pôsobení mutagénu sa alikvotný podiel spórovej suspenzie odobral a riedil s 1 % roztokom glycínu. Po ďalšom riedení volenom tak, aby na povrchu agarových platní vyrástali monokolónie, sa 0,1 ml spórovej suspenzie rozotrela po povrchu sladínového agaru /ako u príkladu 1/. Po 48 až 72 hod. kultivácii pri 34°C sa vyrastené monokolónie preniesli na šikmý sladínový agar a postupne po vyrastení boli hodnotené povrchovou kultiváciou na slamovom substráte. Kmeň *Coprinus* sp. C_{20} , získaný podmienkami podľa tohoto pokusu dosiahol v prevádzkových podmienkach produkciu 19,8 % N-látok na gram sušiny.

P r í k l a d 3

K 1 kg slamového substrátu sparenému horúcou - 95°C - vodou počas 60 min. sa pridá 3,5 litra vodného roztoku, ktorý obsahuje 32 g močoviny a 1,6 g KH_2PO_4 . Substrát sa naočkuje vegetatívnym inokulom obsahu 7,5 až 10 % objemových na objem substrátu jedným z kmeňov *Coprinus* sp. C_{20} , získanými podľa príkladu 1 alebo 2. Naočkováný substrát sa rozostrie vo 5 až 8 cm hrubej vrstve na kultivačné misy a nechá sa kultivovať pri teplote 28 až 36°C a vysokej vlhkosti vzduchu po dobu 10 až 12 dní. Získaný produkt obsahuje 18 až 21 % N-látok na gram sušiny a 3,5 až 4,5 % vodorozpustných redukujúcich cukrov.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob šľachtenia kmeňa bazidiomycety *Coprinus* sp. vyznačujúci sa tým, že na spóry kmeňa sa pôsobí mutagennými látkami reagujúcimi s jeho celulárnou desoxyribonukleinovou kyselinou v zmysle alkylačných reakcií, ako sú 0,005 až 0,04 M tris/beta-chloretylamín/hydrochlorid alebo 0,005 až 0,04 M N-yperit a látkami blokujúcimi SH-skupiny, ako sú 0,005 až 0,01 M jodacetamid alebo N-etylmaleimid po dobu 10 až 30 minút, ďalej sa alikvotný podiel sporovej suspenzie riedi 1 % roztokom glycínu a vyseje sa na povrch agarovej platne a po vyrastení sa kultivuje na slamovom substráte alebo sa kultivuje pri teplote 28 až 36°C za vysokej vlhkosti vzduchu na upravenom slamovom substráte, a to tak, že sa k slamovému substrátu

sparenému 95 °C vodou přidá roztok látek obsahujících dusík, draslík a fosfor, s výhodou vo forme močoviny a draselných solí kyseliny fosforečné.

2. Kmeň bazidiomycety *Coprinus* sp. C₂₀ CCMF-674, degradující celulózu v slamovém substrátu, získaný způsobem podle bodu 1.