

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 147128 B



DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 3851/77

(51) Int.Cl.<sup>3</sup>: C 12 N 1/14

(22) Indleveringsdag: 30 aug 1977

(41) Alm. tilgængelig: 01 mar 1978

(44) Fremlagt: 16 apr 1984

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 30 aug 1976 JP 51/103379 31 aug 1976 JP 51/104186

(71) Ansøger: \*KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA; Tokyo, JP.

(72) Opfinder: Chikao \*Yoshikumi; JP, Yoshio \*Omura; JP, Toshihiko \*Wada; JP, Hiromitsu \*Makita; JP,  
Takao \*Ando; JP, Noriyuki \*Toyoda; JP, Kenichi \*Matsunaga; JP.

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et monokaryo-  
tisk mycelium af en basidiomycetsvamp af arten  
*Coriolus versicolor*

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et monokaryotisk mycelium af *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel., som er en basidiomycet hørende til slægten *Coriolus* af Polyporaceae-familien, hvis mycelium hidtil kun har været kendt i den dikaryotiske form.

I den senere tid har man erkendt den store nytte af de polysaccharider, der fås ved ekstraktion af *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. eller en kultur deraf som grundbestanddel ved fremstilling af medikamenter eller levnedsmidler og drikkevarer, og forskellige forsøg på at fremstille denne basidiomycet i højt udbytte ved dyrkning er blevet foreslået. Ikke desto mindre har der hidtil ikke været nogen fordelagtig metode til opformering af basidiomyceten i højt udbytte til rådighed.

DK 147128 B

Under studier med henblik på at opnå højt ydende opformering af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. viste det sig, at når denne basidiomycet underkastes submers dyrkning under gennemførelse af en mekanisk behandling, nemlig formaling eller forskydningspåvirkning i et væskeformigt medium, mister basidiomyceten øskencelleformen, hvilket er dens naturlige morfologiske egenskab, og forandres til et monokaryotisk mycelium, og at det således dannede monokaryotiske mycelium er stabilt og tillige har den særlige egenskab, at det har en særdeles høj opformeringshastighed sammenlignet med det kendte dikaryotiske mycelium.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af et monokaryotisk mycelium af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved, at et dikaryotisk mycelium af svampearten underkastes en forskydnings- eller formalingsbehandling med en homogenisator eller omrører under eller uden anvendelse af et kemisk inert, fastformigt kornformet materiale i et vandigt, flydende dyrkningsmedium, som i alt væsentligt indeholder 5-10 vægtprocent glucose og 0,75-1,5 vægtprocent gærekstrakt, hvorefter eller samtidig hermed det delte eller formalte mycelium dyrkes i en submers kultur, og det således frembragte monokaryotiske mycelium, der har en højere formeringshastighed end det dikaryotiske mycelium, udvindes fra kulturmediet.

Opfindelsen skal i det følgende beskrives nærmere under henvisning til tegningen, hvor:

fig. 1 er en grafisk afbildning, der sammenlignende viser en vækstkurve i en beluftet og omrørt kultur af det monokaryotiske mycelium hidrørende fra Coriolus versicolor (Fr.) Quel., som fås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, og en tilsvarende vækstkurve for det kendte dikaryotiske mycelium,

fig. 2 og 4 er mikrofotografier af det dikaryotiske mycelium fremkommet fra en skråkultur af Coriolus versicolor (Fr.) Quel., og

fig. 3 er et mikrofotografi af det monokaryotiske mycelium tilvejebragt ifølge den foreliggende opfindelse.

I den grafiske afbildning på fig. 1 er myceliumkoncentrationen (g/l) i substratet afbildet som ordinat og dyrkningstiden (timer) som abscisse. Endvidere betegner (I) væstkurven for det dikaryotiske mycelium og (II) væstkurven for det monokaryotiske mycelium.

Det er en generel antagelse, at svampe, der danner en paddehat, danner basidiesporer, og at disse sporer spirer under dannelse af det primære mycelium bestående sædvanligvis af monokaryotiske hyfer, og at dette mycelium sammensmeltes under dannelse af sekundært mycelium bestående af dikaryotiske hyfer. Det hævdes, at det monokaryotiske mycelium ikke har evne til at danne frugtlegemer, men at det dikaryotiske mycelium besidder denne evne. Der findes ingen litteratur vedrørende dannelsen af det monokaryotiske mycelium fra sporerne i Coriolus versicolor (Fr.) Quel. Endvidere var det hvide luftmycelium, der dannedes i forsøgene ved dyrkning af sporerne, dikaryotisk, og dette viser sig at skyldes, at det monokaryotiske mycelium fra sporerne hurtigt omdannes til dikaryotisk mycelium.

Det monokaryotiske mycelium, der dannes ud fra det dikaryotiske mycelium ifølge den foreliggende opfindelse, kan holdes stabilt, hvilket udgør en slående forskel fra det eksisterende dikaryotiske mycelium. Nedenstående Tabel 1 viser forskellene mellem det monokaryotiske mycelium af Coriolus versicolor (Fr.) Quel., der fås ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, og det dikaryotiske mycelium.

Tabel 1

	Dikaryotisk mycelium	Monokaryotisk mycelium (ifølge opfindelsen)
<u>Forekomst</u>		
1. Submers dyrkning	Ikke-suspenderet tilstand.	Suspenderet tilstand.
2. Pladekultur	Luftmycelium dannet.	Ikke dannet.
<u>Mikroskopisk undersøgelse</u>		
3. Dannelse af øskencelle	Observeret.	Ingen.
4. Myceliumform	Lang og fin.	Kortere og langt tykkere end dikaryotisk mycelium.
<u>Fysiologiske og biokemiske egenskaber</u>		
5. Opformeringshastighed	Lav.	Høj.
6. Celluloseassimilering	Positiv.	Svagt positiv.
7. Kaliumnitrat som eneste nitrogenkilde	Ingen vækst.	Vækst.
8. Thiamin	Påkrævet.	Ikke påkrævet.
9. Lakmusmælkesubstrat	Syrnet.	Ikke syrnet.

Det skal yderligere bemærkes i forbindelse med de i ovenstående tabel angivne egenskaber, at det sædvanlige dikaryotiske mycelium fremkommet ved dyrkning af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. ifølge en sædvanlig fremgangsmåde har form af småkugler. På den anden side har det monokaryotiske mycelium, som fremkommer efter dyrkning, ikke form som småkugler, og kulturen udviser en turbiditetstilstand som pulp suspenderet i vand, hvilket udgør en tydelig forskel fra det sædvanlige dikaryotiske mycelium. Tælling af kerner i cellen gennemførtes endvidere for første gang af opfinderne i nærværende ansøgning, og til denne tælling benytttes følgende udstyr og teknik.

Helly's fikseringsvæske tilsættes først til basidiomycetmyceliet, og derefter får dette mycelium lov at henstå i sædvanligvis ca. 24 timer og vaskes derefter med vand, indtil det er affarvet. Det således fremkomne mycelium neddykkes i 1N saltsyreopløsning, og opløsningen opvarmes til en temperatur på 60°C. Efter afkøling til stuetemperatur og vask med vand, neddykkes det yderligere i 20-50 gange fortyndet salpetersyreopløsning efterfulgt af yderligere vask med vand. Neddykningsperioden er fra 10 til 20 minutter i saltsyreopløsningen og nogle få minutter i salpetersyreopløsningen. De således fremkomne fibrøse celler udbredes på et præparatglas og forbliver derpå, indtil fugtigheden er dampet væk, og derefter tildryppes Giemsa's opløsning. På det tidspunkt, hvor farvning med opløsningen er opnået (ca. 10 minutter senere), vaskes cellerne let med vand og tørres derefter. Efter tørring iagttages cellerne under et lysmikroskop med en forstørrelse på 1000x, og de cirkulære rødfarvede pletter (der anses for at være kerner) tælles. Antallet af kerner kan således bestemmes ved at tælle de rødfarvede pletter i én celle.

"Helly's fikseringsvæske", som benyttes i denne forbindelse, er en opløsning, hvoraf der fremstilles en basis ved at opløse 2,5 g kaliumdichromat, 1 g natriumsulfat og 5 g mercurichlorid i 100 ml vand, og umiddelbart inden brug tilsættes denne basisopløsning yderligere formalin i en mængde på 5 ml pr. 100 ml af opløsningen.

"Giemsa's opløsning" er en kernefarvningsopløsning fremstillet ved at opløse 3,0 g azur II eosin (en blanding af lige mængder azur I, methylenblåt og eosin) og 0,8 g azur II (en blanding af lige mængder azur I og methylenblåt) i 250 ml glycerin ved opvarmning til 60°C, yderligere tilsætning af 250 ml methylalkohol, henstilling af den blandede opløsning i 24 timer og derefter filtrering af opløsningen. Ved brug fortyndes den således fremstillede lageropløsning ved tilsætning af en phosphorsyre-pufferopløsning (pH 6,4-6,8) i en mængde på 100 ml til 3 ml af lageropløsningen.

Som resultat af målingerne ved den ovenfor beskrevne fremgangsmåde fandtes, at antallet af kerner i én celle af det sædvanlige, kugleformede mycelium er to, hvorimod antallet i myceliet af suspensionstypen ifølge opfindelsen er én.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan det dikaryotiske mycelium af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. formales ved tilsætning af inaktive faste kornformede materialer, såsom glasperler, eller myceliet kan udsættes for forskydningsspændinger ved hjælp af et omrøringselement.

Findelingen udføres i en sådan grad, at der ikke ses noget kugleformet mycelium ved iagttagelse udefra.

Atmosfæren omkring den submerse kultur holdes fortrinsvis ved et reduceret oxygenpartialtryk. Det reducerede oxygenpartialtryk kan tilvejebringes ved at holde fermenteren lufttæt eller ved at lade en inert gas, såsom nitrogengas eller carbondioxydgas, strømme ind i fermenteren.

Den submerse dyrkning gennemføres fortrinsvis kontinuerligt under yderligere tilførsel af det væskeformige substrat.

I en udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres den submerse dyrkning ved successiv podning af én af en flerhed af dyrkningsmedier.

Dyrkningen gennemføres sædvanligvis ved en temperatur på  $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$  over en periode på 3-15 dage.

Det viste sig, at det monokaryotiske mycelium af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. fremkommet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen bevarer samme tilstand og samme egenskaber altid, hvis dyrkning til dannelse af monokaryotisk mycelium fortsættes under ovennævnte betingelser. Dette betyder, at det monokaryotiske mycelium fremkommet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kommer ud som samme monokaryotiske mycelium i næste generation, hvorved de i tabel 1 viste egenskaber for monokaryotisk mycelium opretholdes.

Ved pladedyrkning eller overfladedyrkning (stationær dyrkning) af det monokaryotiske mycelium er det utilbøjeligt til at danne luftmycelium, men luftmycelium vil blive dannet, hvis dyrkningen fortsættes i adskillige måneder. Dette luftmycelium er dikaryotisk, og når det indpodes i væksttræ (eng.: bed log) for at danne frugtlegemer, fandtes disse at være Coriolus versicolor (Fr.) Quel. selv. Dette viste, at det dannede mycelium er nøjagtigt det samme som det oprindelige.

Disse resultater indicerer, at det monokaryotiske mycelium af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er afledt af det oprindelige dikaryotiske mycelium af Coriolus versicolor (Fr.) Quel.

Det monokaryotiske mycelium fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er et nyt mycelium, som for første gang udvikledes ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, og dette nye mycelium betegnedes Coriolus versicolor (Fr.) Quel. GX-101-3 og deponeredes under nummeret FERM-P nr. 3686 den 25. august 1976 i The Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science

and Technology (Chiba-shi, Japan), hvilket er et japansk regeringsorgan.

De karakteristiske træk ved det monokaryotiske mycelium af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er som vist i Tabel 1, men den største industrielle betydning af svampen ligger i dens høje propageringshastighed. Svampens propageringshastighed er fra 1,5 til 10 gange så høj som propageringshastigheden for det oprindelige dikaryotiske mycelium, og det er klart, at denne høje propageringshastighed er yderst fordelagtig ved industriel produktion.

Det monokaryotiske mycelium kan benyttes til samme formål som det dikaryotiske mycelium af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. F.eks. er det muligt at tilvejebringe nitrogenholdigt polysaccharid ved ekstraktion af myceliet med et vandigt medium (såsom vand, fortyndet alkalisk opløsning eller fortyndet sur opløsning), og dette nitrogenholdige polysaccharidmateriale kan benyttes til fremstilling af medikamenter, såsom antitumorigene midler, immunitetsstimulerende midler, antivirale midler, antifungale midler, anti-leprøse midler, appetitfremmende midler, m.v.

Det er også muligt at udvinde forskellige typer enzymer, såsom protease, amylase, etc. ved lavtemperaturrekstraktion. Endvidere kan selve myceliet eller ekstrakter eller remanenser heraf benyttes til levnedsmidler og drikkevarer, dyrefoder og plantegødning.

Opfindelsen vil nu blive nærmere beskrevet ved hjælp af nogle foretrukne udførelsesformer. I nedenstående beskrivelse af udførelsesformer er procentangivelser på vægtbasis med mindre andet er angivet.

#### Eksempel 1

Fremstilling af monokaryotisk mycelium:

100 ml af et væskeformigt substrat indeholdende 5% glucose (fremstillet af Showa Sangyo Co., Ltd.) og 0,75% gærekstrakt (fremstillet af Kyokuto Seiyaku Kogyo Co., Ltd.) pipetteredes i en 500 ml konisk kolbe, og efter 20 minutters dampsterilisering ved 120°C i en autoklave, indpodedes i mediet 1 ml af en suspension af mycelium fremkommet ved at dispergere myceliet af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. (fremkommet fra 20 dages stationær dyrkning ved 25°C under anvendelse af 50 ml væskeformig substrat indeholdende 3% glucose og 0,5% gærekstrakt i 60 ml fysiologisk saltopløsning ved at opbryde mycelie-

måtten med en blender ved en hastighed på 6000 omdrejninger pr. minut i 3 minutter), hvorefter rystedyrkning påbegyndtes under anvendelse af hastigheden 200 omdrejninger pr. minut ved 25°C. 3 dage efter dyrkningens start overførtes det dyrkede materiale aseptisk til et 200 ml blenderbæger (fremstillet af Sakuma Seisakujo) og efter formaling af materialet med en homogeniseringsblander (fremstillet af Sakuma Seisakujo) ved hastigheden 10.000 omdrejninger pr. minut i 10 minutter genoptoges rystedyrkningen straks, således at rystedyrkning udøvedes i en samlet periode på 7 dage. Det således dyrkede mycelium havde ingen øskencelledannelse, og dannelsen af luftmycelium i et sædvanligt agarpladesubstrat var beskedent. Resultatet af mikroskopisk undersøgelse efter den nedenfor beskrevne farvning viste, at det fremkomne mycelium var helt igennem monokaryotisk.

#### Farvning:

1 ml af kulturvæsken indeholdende mycelium fremkommet på den ovenfor beskrevne måde tilsættes 10 ml vand og underkastes derefter centrifugalseparering ved 2000-5000 G i 5 minutter. Supernatantvæsken fjernes, og myceliet overføres til et reagensglas, hvortil Helly's fikseringsvæske sættes. Efter 20 minutters henstand vaskes de fraskilte celler med 10 ml vand, indtil de er affarvet. Derefter anbringes cellerne i 10 ml 1N saltsyre og opvarmes til 60°C i 15 minutter efterfulgt af afkøling til stuetemperatur, vask med 10 ml vand, 2 minutters neddykning i 10 ml 20-50 gange fortyndet salpetersyreopløsning og 2-3 ganges vask med 10 ml vand.

De fremkomne fibrøse celler spredes på et præparatglas for at lade fugtighed afdampe og derefter tilsættes nogle få dråber Giemsa's opløsning på cellerne, og efter 15 minutters henstand vaskes de let med vand og tørres derefter.

Når den således kernefarvede celle iagttages under et mikroskop ved forstørrelsen 1000x, ses hver kerne som en cirkulær rødfarvet plet. Antallet af kerner kan derfor let bestemmes ved at tælle de cirkulære rødfarvede pletter i én celle af myceliet. Det fremkomne mycelium kunne ikke syrne lakmuskalk og havde ingen gelatineforflydende evne.

#### Propagering af monokaryotisk mycelium:

Det monokaryotiske mycelium fremkommet på den ovenfor beskrevne måde tilførtes 12 liter af et væskeformigt substrat indeholdende 5% glucose og 0,75% gærekstrakt i en 20 liters glasfermenter

(fremstillet af Kyoritsu Riko Co., Ltd.), der forud var steriliseret ved indblæsning af  $2 \text{ kg/cm}^2$  damp direkte i glasfermenteren. Efter dampsterilisering ved  $120^\circ\text{C}$  i 20 minutter og afkøling indpodedes 1 liter suspension indeholdende det monokaryotiske mycelium (ved hastigheden  $0,5 \text{ g/l}$ ), hvorefter dyrkning ved en beluftningshastighed på  $0,5 \text{ min.}^{-1}$  og en omrøringshastighed på 550 omdr. pr. minut fulgte umiddelbart. Af sammenligningsgrunde gennemførtes dyrkning af det dikaryotiske mycelium under fuldstændig samme betingelser som de ved dyrkning af det monokaryotiske mycelium anvendte. Når propageringshastighederne af disse mono- og dikaryotiske mycelier sammenlignes ved hjælp af den tid, der kræves for at opnå en myceliekoncentration på  $8 \text{ g/l}$ , bemærkes det, at det monokaryotiske mycelium kun kræver  $1/4$  af dyrkningstiden for det dikaryotiske mycelium (se fig. 1). Det bekræftedes også, at propageringsudbyttet af det monokaryotiske mycelium steg med ca. 20% i forhold til udbyttet af det dikaryotiske mycelium.

#### Eksempel 2

Beregning af antallet af kerner gennemførtes på den i eksempel 1 beskrevne måde på mycelium fremkommet ved skrådyrkning af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. Som resultat fandtes det, at alle disse celler er dikaryotiske, som det fremgår af fotografiet i fig. 2, og intet monokaryotisk mycelium påvistes.

Denne kendte svamp er betegnet Coriolus versicolor (Fr.) Quel. CM-101 og er deponeret under nummeret FERM-P nr. 2412 den 25. december 1973 i det tidligere nævnte japanske regeringsorgan.

100 ml af et væskeformigt substrat indeholdende 5% glucose og 0,75% gærekstrakt anbragtes i en 500 ml konisk kolbe og steriliseredes deri under opvarmning. Dette substrat indpodedes derefter det ovenfor nævnte dikaryotiske mycelium ved anvendelse af en platinpodeøsken og gjordes til genstand for 3 dages rystedyrkning (fordyrkning) i et rum, hvis temperatur var reguleret til  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Som følge heraf dannedes mycelium i form af småkugler. Kulturvæsken indeholdende dette mycelium med småkugleform homogeniseredes ved hjælp af en homogeniseringsblender (fremstillet af Sakuma Seisakujo) i 5 minutter og underkastedes derefter en behandling med forskydningspåvirkning, hvorved kugleformen stort set forsvandt. Dyrkningen fortsattes under ovennævnte betingelser, og 4 dage senere (hoveddyrkning) homogeniseredes det dannede mycelium med småkugleform igen i 5 minutter, og underkas-

tedes derefter en behandling med påvirkning af forskydningsspændinger. Koncentrationen af celler af svampen var på dette stadium 11 g/l.

1 ml kulturvæske indeholdende det homogeniserede mycelium tilsattes til samme substrat, som anvendtes i første dyrkningstrin, og gjordes derefter til genstand for det andet dyrkningstrin under samme betingelser som i første dyrkningstrin. Imidlertid forandredes dyrkningsperioden en smule, idet fordyrkningen gennemførtes i 3 dage og hoveddyrkingen også i 3 dage. Svampecellekoncentrationen var af stort set samme niveau som i første rystedyrkningstrin.

Det tredje dyrkningstrin fortsattes på lignende måde, idet svampecellekoncentrationen nåede stort set samme niveau som i første rystedyrkningstrin ved 2 dages fordyrkning og 3 dages hoveddyrking.

På tilsvarende måde gennemførtes det fjerde dyrkningstrin, hvorved der fremkom en kulturvæske med en svampecelle koncentration på 12 g/l, hvilket er højere end koncentrationen i første dyrkningstrin, ved 2 dages fordyrkning og 2 dages hoveddyrking. Det fremkomne mycelium havde ikke form af småkugler og var dispergeret i form af pulp og krævede ingen homogeniseringsbehandling. Iagttaget i et mikroskop viste svampecellen ikke nogen øskencelleform, hvilket findes i det sædvanlige dikaryotiske mycelium, og dens bredde var ca. dobbelt så stor som for det dikaryotiske myceliums vedkommende.

Ved måling af antallet af kerner ved den i Eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde konstateredes det, at disse celler alle er monokaryotisk mycelium, som det ses på mikrofotografiet i fig. 3.

Når myceliet dyrkedes videre under samme betingelser som i det foregående dyrkningstrin, bestod det propagerede mycelium af det monokaryotiske mycelium og havde alle de egenskaber, som det monokaryotiske mycelium er i besiddelse af, og som er vist i Tabel 1.

Det viste sig også, at det monokaryotiske mycelium havde en propageringshastighed, der var mere end dobbelt så stor som det dikaryotiske myceliums propageringshastighed.

10 g af det tørrede produkt af det monokaryotiske mycelium fremkommet ved den ovenfor beskrevne fremgangsmåde ekstraheredes med 300 ml varmt vand ved 95-100°C i 3 timer. Ekstraktopløsningen koncentreredes under reduceret tryk til 30°C og tilsattes derefter ren ethanol til koncentrationen 90%, og det dannede bundfald tørredes, hvorved 2 g gråt pulver fremkom. En kemisk analyse af dette grå pulver afslørede, at der var tale om et nitrogenholdigt polysaccharid af høj molekylvægt. Når dette stof indgaves mus transplanteret med Sarcoma-180 (solid type), udvistest høj antitumorigen effekt.

### Eksempel 3

100 ml af et væskeformigt substrat indeholdende 5% glucose og 0,75% gærekstrakt tilførtes en konisk kolbe med rumfanget 500 ml, hvori der allerede var anbragt 8 g glaskugler med en diameter på 2-5 mm, og dette blandede substrat indpodedes efter varmesterilisering samme dikaryotiske mycelium af Coriolus versicolor (Fr.) Quel., som benyttedes i Eksempel 1, under anvendelse af en platinøsken og gjordes derefter til genstand for 7 dages rystedyrkning ved 25  $\pm$ 2°C.

1 ml kulturvæske indeholdende det således fremkomne mycelium tilførtes til substratet med glaskuglerne som nævnt ovenfor og gjordes yderligere til genstand for en anden 6-dages rystedyrkning. Det fremkomne produkt gjordes yderligere til genstand for et tredje rystedyrkningstrin over en periode på 5 dage.

Det derved fremkomne mycelium havde ingen øskencelleform og en bredde, der var ca. 1,5 gange så stor som det oprindelige dikaryotiske mycelium, og resultatet af kernetælling på den i Eksempel 1 angivne måde viste, at det var monokaryotisk mycelium.

1 ml af denne kulturvæske indpodedes i 100 ml af et væskeformigt medium indeholdende 5% glucose og 0,75% gærekstrakt, der ikke indeholdt glaskugler, og dyrkedes ved 25  $\pm$ 2°C. Den dannede myceliumkoncentration 3 dage efter dyrkningens start var 10,5 g/l, medens tilsvarende dyrkning af det dikaryotiske mycelium gav en koncentration på 7 g/l 4 dage efter dyrkningens start.

### Eksempel 4

100 ml af et væskeformigt substrat indeholdende 5% glucose og 0,75% gærekstrakt anbragtes i en 500 ml konisk kolbe, og dette substrat indpodedes efter varmesterilisering samme dikaryotiske mycelium af Coriolus versicolor (Fr.) Quel., som benyttedes i Eksempel 1, under anvendelse af en platinpodeøsken og gjordes derefter til genstand for rystedyrkning i 3 dage. Efter en homogeniseringsbehandling dækkedes hele fermenteren af en polyethylenpose og forseglede mod den omgivende luft, hvorefter 4 dages dyrkning fulgte.

Ved dyrkningens afslutning indeholdt fermenteratmosfæren 5% CO<sub>2</sub>-gas.

1 ml kulturvæske indeholdende det således fremstillede mycelium indpodedes i substratet på den i første dyrkningstrin beskrevne måde og underkastedes derefter det andet rystedyrkningstrin på samme måde som første trin. Denne dyrkning blev yderligere gentaget 2 gange.

Som resultat af samme måling, som gennemførtes i Eksempel 1, fandtes, at myceliet fremstillet ved denne dyrkningsproces var helt igennem monokaryotisk.

#### Eksempel 5

Der udtoges en prøve af myceliet fremkommet ved dyrkning af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. på skrå substrat, og dette mycelium underkastedes kernebestemmelse ifølge den i Eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde, hvorved det konstateredes, at hele myceliet er dikaryotisk, og at der ikke var noget monokaryotisk mycelium til stede, hvilket ses på fotografiet på fig. 4. Dette indicerer, at myceliet fremkommet ved dette dyrkningstrin er dikaryotisk mycelium.

Svampen er Coriolus versicolor (Fr.) Quel. CM-103 og er deponeret under deponeringsnummeret FERM-P nr. 2414 den 25. december 1973 i førnævnte japanske regeringsorgan.

100 ml Af et væskeformigt substrat indeholdende 5% glucose og 0,75% gærekstrakt anbragtes i en konisk kolbe med rumfanget 500 ml og indpodedes efter varmesterilisering myceliet af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. CM.103 under anvendelse af en platinpodeøsken, hvorefter 7 dages rystedyrkning ved  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  fulgte. Myceliet i denne kultur var dikaryotisk og tilstede i en koncentration på 10,8 g/l.

Det således fremkomne dikaryotiske mycelium indpodedes med 0,01% i 20 liter af et væskeformigt substrat, hvori der var opløst 10% glucose og 1,5% gærekstrakt, og myceliet gjordes til genstand for submers dyrkning under omrøring i en fermenter indstillet til  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  under anvendelse af en omrører af skovltypen ved hastigheden 500 omdr. pr. minut. Efter 7 dages dyrkning var der dannet mycelium i en koncentration på 10,2 g/l i kulturvæsken. 20 ml af denne kulturvæske indpodedes i samme substrat, og andet dyrkningstrin gennemførtes under samme betingelser over en periode på 6 dage. En tilsvarende dyrkning gentoges over en periode på 5 dage i tredje dyrkningstrin og over en periode på 4 dage i fjerde dyrkningstrin.

Efter afslutning af det fjerde dyrkningstrin havde kulturvæsken form af ensartet pulp og indeholdt det dannede mycelium i en koncentration på 11,5 g/l. Myceliet havde ingen øskencelleform og var udelukkende monokaryotisk mycelium.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et monokaryotisk mycelium af en basidiomycetsvamp af arten Coriolus versicolor (Fr.) Quél., k e n d e t e g n e t ved, at et dikaryotisk mycelium af svampearten underkastes en forskydnings- eller formalingsbehandling med en homogenisator eller omrører under eller uden anvendelse af et kemisk inert, fastformigt kornformet materiale i et vandigt, flydende dyrkningsmedium, som i alt væsentligt indeholder 5-10 vægtprocent glucose og 0,75-1,5 vægtprocent gærekstrakt, hvorefter eller samtidig hermed det delte eller formalte mycelium dyrkes i en submers kultur, og det således frembragte monokaryotiske mycelium, der har en højere formeringshastighed end det dikaryotiske mycelium, udvindes fra kulturmediet.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den submerse dyrkning udføres ved en temperatur på ca. 25  $\pm$ 5°C i et tidsrum på 3-15 dage.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den submerse dyrkning udføres i en lufttæt beholder eller i en nitrogen- eller carbondioxidatmosfære.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den submerse dyrkning udføres kontinuerligt, medens der yderligere tilføres vandigt, flydende dyrkningsmedium.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den submerse dyrkning udføres ved successiv podning af én af en flerhed af dyrkningsmedier.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 3756/77 (PL § 2.2.3).

FIG. 1

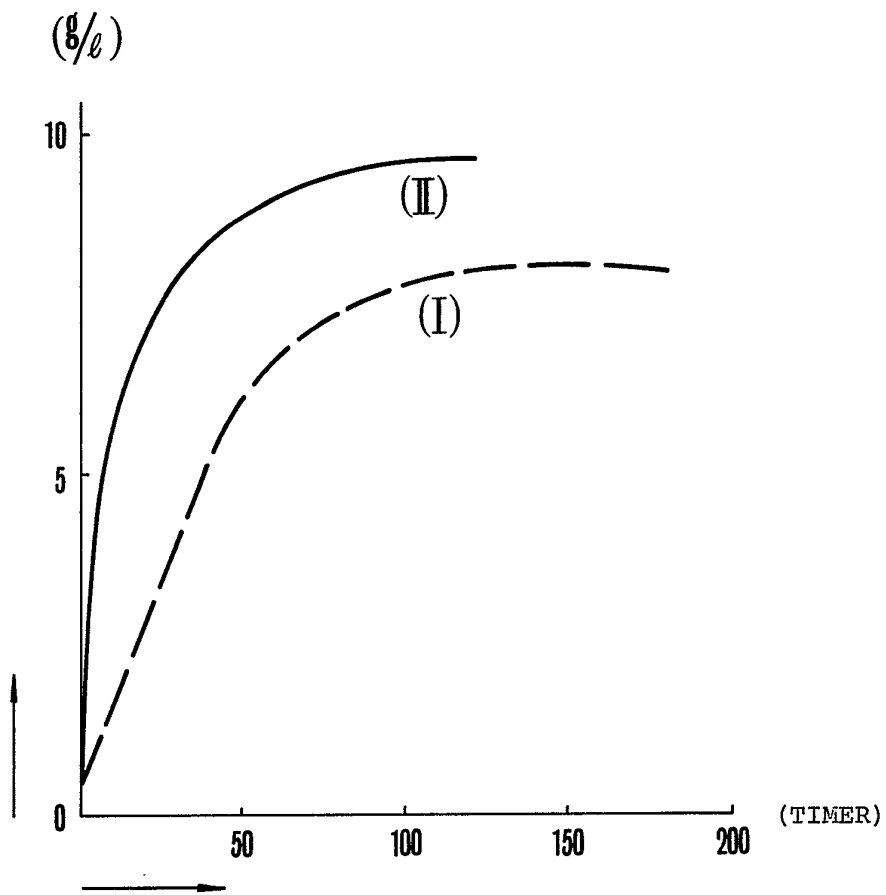


FIG.2



FIG.3

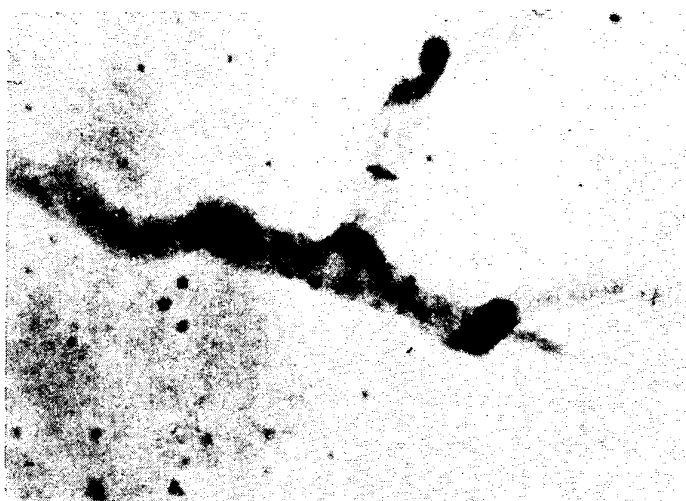


FIG.4

