

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial

20 JUL. 1978

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria anejada.

ES

11

21

22

NUMERO

461820

FECHA DE PRESENTACION

23 AGO. 1977

10

A1



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
nº 51-103379	30-8-1976	JAPON
nº 51-104186	31-8-1976	JAPON.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION
Procedimiento para la obtención de un nuevo micelio monocariótico del hongo coriolus versicolor.

71 SOLICITANTE (S)
KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA. (sociedad japonesa)¹.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
TOKYO (JAPON) Nº 8, Horidome-cho 1-chome, Nihonbashi, Chuo-ku¹.

72 INVENTOR (ES) 1) Chikao YOSHIKUMI¹. 2) Yoshio OMURA¹. 3) Toshihiko WADA¹. 4) Hiromitsu MAKITA. 5) Tabao ANDO¹. 6) Noriyuki TOYODA. y 7) Kenichi MATSUNAGA¹. (todos de nacionalidad japonesa)¹.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. CARLOS ROEB UNGEHEUER¹.

1 El presente invento se relaciona con un procedimiento para producir un nuevo micelio monocariótico del coriolus versicolor (Fr.) Quéél. que es un conocido basidiomiceto perteneciente al género de coriolus de las poliforáceas.

5 La elevada utilidad de los polisacaruros obtenidos de la extracción del coriolus versicolor (Fr.) Quéél. o de su cultivo como componente de base para la preparación de drogas medicinales o alimentos y bebidas, ha llegado a conocerse recientemente y se han propuesto varios intentos para producir tal basidiomiceto por cultivo artificial en un elevado rendimiento. No obstante a ello todavía no hay disponible ningún método ventajoso capaz de propagar el basidiomiceto en un alto rendimiento.

15 En el transcurso del presente estudio, destinado a realizar la propagación con alto rendimiento de coriolus versicolor (Fr.) Quéél. Los inventores han hallado que, cuando este basidiomiceto es sometido a cultivo sumergido mientras se efectúa tratamiento mecánico, tal como molienda o cizallamiento en un medio rígido, el basidiomiceto pierde la conexión de agarre que es una característica intrínseca morfológica y se cambia a un micelio monocariótico y porque el micelio monocariótico así formado es estable y también tiene una característica específica, consistente en que es extremadamente elevado el régimen de propagación en comparación con el micelio dicariótico conocido.

25 Un objeto del presente invento es procurar un procedimiento para producir un micelio monocariótico no teniendo ninguna conexión de agarre, efectuando un tratamiento mecánico sobre un basidiomiceto conocido, coriolus versicolor (Fr.) Quéél.

30

1 compuesto de micelio dicariótico en un medio líquido o sometiendo tal basidiomiceto a cultivo sumergido bajo el tratamiento mecánico.

Otros objetos de este invento resultarán evidentes de la siguiente descripción detallada del invento.

5 En los dibujos:

La fig. 1, es un gráfico mostrando comparativamente una curva de propagación en cultivo aireado y agitación del micelio monocariótico, derivado del *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. de acuerdo con el procedimiento de este invento y una curva de propagación similar del micelio dicariótico conocido.

10 Las figs. 2 y 4 son microfotografías del micelio dicariótico obtenido del cultivo en declive de *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel.; y

15 La fig. 3, es una microfotografía del micelio monocariótico obtenido de acuerdo con el presente invento.

En el gráfico de la fig. 1, la concentración del micelio - (g/l) en el medio se registra como ordenada y el tiempo de cultivo (hr) como abscisa. También (I) indica la curva de propagación de micelio dicariótico y (II) la curva de propagación del micelio monocariótico.

20 Se cree generalmente que los hongos, que constituyen una seta producen las basidiosporas y que tales esporas germinan para formar el micelio primario, consistente usualmente en monocariones y tal micelio se funde uniéndose para formar un micelio secundario consistente en los dicariones. Se dice que micelio monocariótico no tienen ninguna habilidad para formar los cuerpos de fruto, pero que el micelio dicariótico tiene tal habilidad. No está disponible ningún informe

25

30

1 concerniente a la generación del micelio monocariótico de
las esporas en *Coriolus versicolor* (Fr.) Qué1. Además, el
micelio aéreo blanco, obtenido en los experimentos de los
inventores, cultivando las esporas, fue dicariótico y esto
parece deberse al hecho de que el micelio monocariótico de
5 las esporas se convierte rápidamente en uno dicariótico.
El micelio monocariótico, obtenido del micelio dicariótico
de acuerdo con este invento, puede mantenerse establemente,
presentando una chocante diferencia con el micelio dicarió-
tico existente. La tabla I posterior enumera las diferencias
10 entre el micelio monocariótico de *Coriolus versicolor* (Fr.)
Qué1 de acuerdo con este invento y el micelio dicariótico.
(sigue la tabla I).

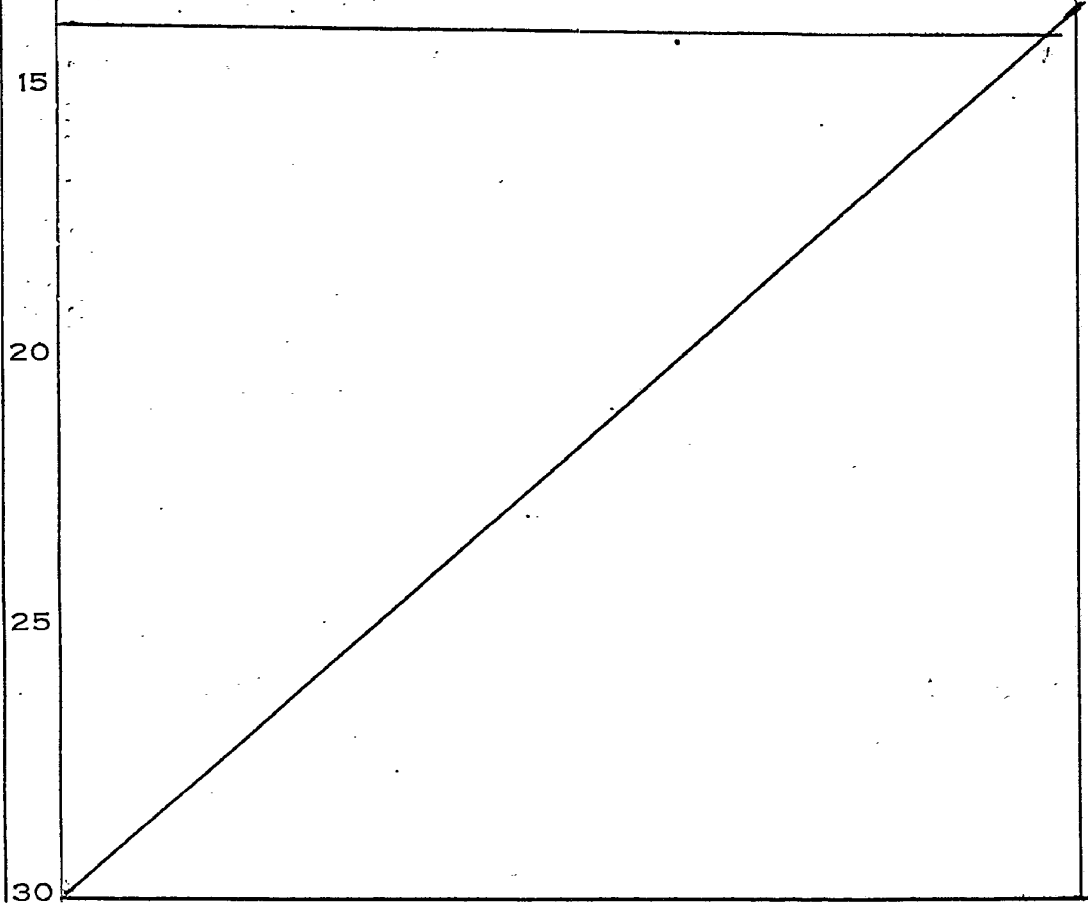


TABLA 1

Conceptos	Micelio dicariótico.	Micelio monocariótico,
	Y	según este invento.
Aspecto		
1. Cultivo sumergido	Condición no suspendida	Condición suspendida.
2. Cultivo de placa	Se forma micelio aéreo	No formado.
Observación microscópica		
3. Formación de conexión de empalme	Observado	Ninguno
4. Forma de micelio	Largo y fino	Más corto y mucho más grueso que el micelio dicariótico.
Propiedades fisiológicas y bioquímicas		
5. Régimen de propagación	Bajo	Alto
6. Asimilación de celulosa	Positiva	Ligeramente positiva
7. Nitrate de potasio con nitrógeno	Ningún crecimiento	Crecimiento
8. Tiamina	Requerida	No requerida
9. Medio de leche de litmo	Acidulado	No acidulado.
	10	20
	15	25
		30

1 Los siguientes datos deben anotarse además en conexión con
las propiedades del respectivo micelio, mostrado en la Tabla
anterior. El micelio dicariótico ordinario, obtenido por el
cultivo de *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. de acuerdo con un
5 método convencional; usualmente se presenta en la forma de
gránulos. Por otra parte, el micelio monocariótico, cuando
se cultiva, no se forma en gránulos y el cultivo adopta una
condición turbia, como si una pulpa se suspendiese en agua,
presentando así una diferencia obvia con el micelio dicarió-
10 tico ordinario. El método para contar núcleos en la célula
fue completado por primera vez en el presente invento y este
método comprende los siguientes medios y técnicas.
Primeramente se añade al micelio de basidiomiceto un fluido
15 fijador de Helly y después se deja reposar este micelio usual-
mente durante alrededor de 24 horas y después se lava con agua
hasta que se decolore. El micelio, así obtenido, es sumergi-
do en solución de ácido clorhídrico 1-N y la solución se
calienta a una temperatura de 60°C. Después de enfriar a tem-
20 peratura ambiente y de lavar con agua se vuelve a sumergir
en 20 a 50 veces de solución de ácido nítrico diluido, segui-
do de lavado adicional con agua. El período de inmersión es
de 10 a 20 minutos en la solución de ácido clorhídrico y de
unos pocos minutos en la solución de ácido nítrico. Las célu-
25 las fibrosas, así obtenidas, se extienden sobre un porta-
objetos de vidrio y se dejan sobre el mismo hasta que se eva-
pore la humedad y después se añade a ello solución de Giemsa,
a gotas. En el punto, en que se consiguió el tñido con la
solución (aproximadamente 10 minutos más tarde) las células
30 se lavan ligeramente con agua y después se secarón. Después

1 de secar las células fueron examinadas bajo un microscopio iluminado de 1000 aumentos y las circulares teñidas de rojo (consideradas como núcleos) fueron contadas, así, el número de núcleos puede ser determinado contando las manchas teñidas de rojo en una célula.

5 El "fluido fijador de Helly", usado aquí, es una solución del que la base se prepara disolviendo 2,5 gr. de bicromato de potasio, 1 gr. de sulfato sódico y 5 gr. de cloruro mercúrico en 100 ml. de agua e inmediatamente antes del uso se añade, a tal solución de base, posteriormente formalina en una cantidad de 5 ml. por 100 ml. de la solución.

10 La "solución de Giemsa" es una solución para teñir núcleo, preparada disolviendo 3,0 gr. de "azur II eosina" y 0,8 gr. de "azur" en 250 ml. de glicerina, calentándola a 60°C, añadiendo además a ello 250 ml. de metil alcohol, dejando reposar la solución mezclada durante 24 horas y filtrando después la solución. En uso, la solución de reserva, así preparada, es diluida añadiendo una solución amortiguadora de ácido fosfórico (pH 6,4 - 6,8) en una cantidad de 100 ml. para 20 3 ml. de la solución de reserva.

25 Como un resultado de las mediciones del método arriba descrito se ha hallado que el número de núcleo en una célula del micelio ordinario, en forma de gránulo, es 2, mientras que aquél del micelio del tipo de suspensión, de acuerdo con este invento, es 1.

30 El micelio monocariótico, exhibiendo las propiedades peculiares, tal como se ha indicado arriba, puede ser producido de acuerdo con este invento, sometiendo el micelio dicariótico de *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. a tratamiento mecánico

1
5
10
15
20
25
30

(físico) tal como molienda o cizallamiento en un medio líquido o sometiendo el micelio dicariótico a cultivo sumergido mientras se practica el tratamiento mecánico sobre el micelio. Más concretamente, este método puede realizarse de las siguientes maneras:

(1) En el caso de someter el micelio dicariótico de *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. a cultivo de sacudidas, el micelio es molido añadiendo materiales granulares sólidos, inactivos, tales como cuentas de vidrio.

(2) En el caso de someter el micelio dicariótico a cultivo sumergido continuo, tal cultivo es realizado mientras se cizalla el micelio con un elemento agitador.

(3) En el caso de someter el micelio dicariótico a cultivo sumergido, el micelio es cizallado o molido con un homogeneizador en una extensión tal, que no se observe ningún micelio en forma de gránulo en observación exterior.

En la formación del micelio monocariótico bajo las condiciones arriba mencionadas es preferible aplicar adicionalmente la siguiente técnica:

(i) Se procura una condición nutritiva enriquecida, usando un medio con una concentración mayor de 1,5 hasta 3 veces al medio ordinario, por ejemplo, un medio de extracto de glucosa-levadura conteniendo 5% de glucosa y 0,75% de extracto de levadura.

(ii) La atmósfera del cultivo sumergido se mantiene a presión parcial de oxígeno reducida. La "presión parcial de oxígeno reducida" puede procurarse manteniendo el fermentador de modo hermético al aire o haciendo fluir un gas inerte, tal como gas de nitrógeno o dióxido de carbono dentro del fermentador.

(iii) El cultivo sumergido se realiza continuamente mientras se suministra adicionalmente el medio líquido.

El micelio dicariótico del *coriolus versicolor* (Fr.) Quéll puede convertirse fácilmente en el micelio monocariótico - empleando los arriba citados métodos (i) - (e) bien sea individualmente o en combinación adecuada por las técnicas (i) - (iii). En el caso de que no pueda obtenerse en una marcha de cultivo la cantidad suficiente de micelio monocariótico, se continúa la operación arriba mencionada hasta homogeneizar el cultivo, hasta obtenerse la cantidad deseada de micelio monocariótico. El cultivo se practica usualmente a la temperatura de $\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 3 a 15 días. Se ha hallado que el micelio monocariótico de *coriolus versicolor* (Fr.) Quéll obtenido de acuerdo con el método de este invento, siempre mantiene el mismo estado, y las mismas propiedades de cultivo se continuaron bajo las condiciones arriba mencionadas para la producción de micelio monocariótico. Esto significa que el micelio monocariótico, obtenido de acuerdo con el método del invento resulta como el mismo micelio monocariótico en la siguiente generación, manteniendo las propiedades del micelio monocariótico mostrado en la Tabla 1.

En cultivo de placa o cultivo de superficie (cultivo estacionario del micelio monocariótico, es contraproducente formar micelio aéreo, pero el micelio aéreo viene a producirse si el cultivo se continúa durante varios meses. Este micelio aéreo es dicariótico y cuando se inocular en un tronco de lecho para formar cuerpos de fruto, demostró ser *coriolus versicolor* (Fr.) Quéll mismo. Esto reveló que el micelio producido es justamente el mismo que el original.

1 Estos datos indican que el micelio monocariótico de corio-
lus versicolor (Fr.) Quéll. de acuerdo con este invento, se
deriva del micelio dicariótico original de ~~coriolus~~ versicolor
(Fr.) Quéll.

5 El micelio monocariótico de este invento es un nuevo micelio
que se ha desarrollado por primera vez por el procedimiento
de este invento y este nuevo micelio fue denominado corio-
lus versicolor (Fr.) Quéll. GX 101-3 y se depositó bajo el
número FERM-P nº. 3686 el 25 de Agosto de 1976 en el Insti-
tuto de Investigación de Fermentación, Agencia de Ciencia y
10 Tecnología Industrial (Chiba-shi, Japón) un organismo gober-
namental japonés.

15 Las peculiaridades características del micelio monocarióti-
co de coriolus versicolor (Fr.) Quéll. de acuerdo con este
invento, son como se ilustra en la Tabla 1, pero el signifi-
cado industrial máximo de este hongo es su elevado grado de
propagación. El grado de propagación de este hongo es de
1,5 a 10 veces tan alto como aquel del micelio dicariótico
original y, obviamente, tan elevado régimen de propagación
20 es extremadamente beneficioso para la producción industrial.

Este micelio monocariótico puede ser aplicado para los mis-
mos propósitos de uso que el micelio dicariótico de corio-
lus versicolor (Fr.) Quéll. Por ejemplo, es posible obtener
polisacaruro conteniendo nitrógeno de su extracción con un
25 medio acuoso (tal como agua, solución alcalina diluida o
solución ácida diluida) y tal sustancia de polisacaruro, -
conteniendo nitrógeno, puede usarse para la preparación de
drogas, tales como agente anti-tumor, agente activador de
inmunidad, droga antiviral, agente antifungal, droga anti-le-
30 persa, droga promotora de apetito, etc.

1 También es posible recoger varias clases de enzimas, tal -
como proteasa, amilasa, por extracción a baja temperatura.
Además, el micelio mismo o sus extractos o residuos puede
ser usados para comidas o bebidas, pienso para animales y
fertilizantes para plantas.

5 Además de lo arriba mencionado, el micelio de este invento
puede ser empleado para todos los usos del coriolus versicolor
(Fr.) Quéll.

10 Este invento se describe ahora en ulterior detalle por medio
de alguna de sus ejecuciones preferidas, pero estas ejecucio-
nes no deben considerarse como restrictivas del alcance de
este invento. En lo que sigue, en la descripción de las eje-
cuciones, (%) es de peso, a no ser que se indique de otro mo-
do.

15 EJEMPLO 1

Producción de micelio monocariótico

20 100 ml. de un medio líquido conteniendo 5% de glucosa (pro-
ducido por Showa Sangyo Co., Ltd) y 0,75% de extracto de leva-
dura (producido por Kyokuto Seiyaku Kogyo Co. Ltd.) fue in-
troducido con pipeta en un frasco cónico de 500 ml. y después
de esterilización al vapor durante 20 minutos a 120°C en un
autoclave, el medio fue inoculado con un ml. de una suspensión
de micelio, preparada dispersando el micelio de coriolus ver-
25 sicolor (Fr.) Quéll. (obtenido de un cultivo estacionario de
20 días a 25°C usando medio líquido en una cantidad de 50 ml.
conteniendo 3% de glucosa y 0,5% de extracto de levadura, en
60 ml. de solución salina fisiológica, rompiendo la estera-
micelial con un mezclador a una velocidad de 6000 r.p.m. -
30 durante 3 minutos) y después se inició la agitación del cul-

1 tivo a una velocidad de 200 r.p.m. a 25°C. 3 días después
del comienzo del cultivo, el material cultivado fue transfe-
rido asépticamente en un mezclador de 200 ml. (fabricado -
por Sakuma Seisakujo) y después de moler el material con un
5 homo-mezclador, fabricado por Sakuma Seisakujo) a la veloci-
dad de 10.000 r.p.m. durante 10 minutos de cultivo sacudido
fue reanudado inmediatamente, para el cultivo de sacudidas
práctico durante el periodo total de 7 días. El micelio, así
cultivado, no tuvo ninguna conexión de empalme y fue pobre en
10 generación de micelio aéreo en un medio de placa de agar -
normalizado. El resultado del examentmicroscópico, después de
teñido, descrito más abajo, mostró que el micelio obtenido
era todo monocariótico.

Teñido:

15 1 ml. de caldo conteniendo el micelio obtenido de la manera
arriba descrita, se añadió con 10 ml. de agua y después se
sometió a separación centrífuga a 2000 hasta 5000 G durante
5 minutos. El líquido, que sobrenadaba, se eliminó y el mico-
lio se transfirió a un tubo de ensayo, al que se añadió flui-
do fijador de Helly.

20 Después de un reposo de 24 horas, las células separadas fue-
ron lavadas con 10 ml. de agua hasta que quedaron decolora-
das. Después, las células se colocaron en 10 ml. de ácido -
clorhídrico 1N y se calentaron a 60°C durante 15 minutos,
25 seguido de refrigeración a temperatura ambiente, lavado con
10 ml. de agua, inmersión durante 2 minutos en 10 ml. de 20
a 50 veces diluida solución de ácido nítrico y de 2 a 3 veces
lavadas con 10 ml. de agua.

30 Las células fibrosas obtenidas se extendieron sobre un porta-

1 objetos de vidrio para dejar evaporar la humedad y después se añadieron a las células algunas gotas de solución de Giemsa, y después de reposo durante 15 minutos se lavaron ligeramente con agua y después se secaron.

5 Cuando la célula, así teñida en el núcleo, fue examinada bajo un microscopio de 1000 aumentos, cada núcleo fue observado como una mancha circular teñida de rojo. Por lo tanto, el número de núcleos puede determinarse fácilmente contando las manchas circulares teñidas de rojo en una célula del micelio. El micelio obtenido no pudo acidular la leche de limo y no tuvo ninguna habilidad liquefactora de gelatina.

Propagación de micelio monocariótico.

15 El micelio monocariótico, obtenido de la manera arriba descrita, fue alimentado con 12 litros de un medio líquido conteniendo 5% de glucosa y 0,75% de extracto de levadura en un vaso de 20 litros de un fermentador (fabricado por Kyoritsu Riko Co., Ltd.), seguido de soplado de 2 kg/cm^2 de vapor directamente sobre el vaso fermentador. Después de esterilización al vapor a 120°C durante 20 minutos y de refrigeración, se inoculó un litro de suspensión conteniendo el micelio monocariótico (al régimen de 0,5 g/l), inmediatamente seguido de cultivo al régimen de aireación de 0,5 v.v.m. y con velocidad de agitación de 550 r.p.m. Para comparación, el cultivo de micelio dicariótico fue realizado completamente bajo las mismas condiciones que aquellas usadas para el cultivo del micelio monocariótico. Cuando los regímenes de propagación de estos micelios mono y dicarióticos se compararon por medio del tiempo requerido para alcanzar la concentración de micelio de 8 g/l, se observó que el micelio monocariótico -

20

25

30

1 requiere solamente 1/4 del tiempo de cultivo del micelio -
dicariótico (véase fig. 1). También fue confirmado que el
rendimiento de propagación del micelio monocariótico aumentó
en alrededor de 20% sobre aquel del micelio dicariótico.

Ejemplo 2

5 El cálculo del número de núcleos se hizo, según la manera
del Ejemplo 1, sobre el micelio obtenido de cultivo en forma
inclinada de *Coriolus versicolor* (Fr.) Quéll. Como resultado
se encontró que, como se ilustra en la fotografía de la fig.
2, todas estas células son dicarióticas y no se detectó nin-
gún micelio monocariótico.

10 Este hongo original fue denominado *Coriolus versicolor* (Fr.)
Quéll. CM-101 y ha sido depositado bajo FERM-P No. 2412 el 25
de diciembre de 1973 en el organismo gubernamental japonés -
arriba mencionado.

15 100 ml. de un medio líquido, conteniendo 5% de glucosa y 0,75
% de extracto de levadura se colocó en un matraz cónico de
500 ml. y se esterilizó en el mismo con calentamiento. Este
medio entonces fue inoculado con el arriba citado micelio -
20 dicariótico, usando un lazo de platino y se sometió a un cul-
tivo de sacudida durante 3 días (precultivo) en una habita-
ción ajustada a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Allí se produje-
ron por consiguiente, micelios en forma de gránulo. El caldo
conteniendo este micelio en forma de gránulo fue homogeneiza-
do por un homo-mezclador (fabricado por Sakuma Seisakujo) du-
25 rante 5 minutos y después se sometió a un tratamiento de ci-
zallamiento por lo que desapareció sustancialmente la forma
de gránulo. El cultivo fue continuado bajo las condiciones arri-
30 ba mencionadas y 4 días más tarde (cultivo principal) el

1 micelio producido en forma de gránulo de nuevo se homogenei-
zó durante 5 minutos y después se sometió a un tratamiento
de cizallamiento. La concentración de células del hongo en
esta etapa fue de 11 g/l.

5 Un lm.³ de caldo, conteniendo el micelio homogenizado, fue
añadido al mismo medio líquido, que se había utilizado en
la primera marcha de cultivo y después se sometió a la segun-
da marcha de cultivo bajo las mismas condiciones que en la
primera marcha. Sin embargo, el período de cultivo se varió
10 ligeramente, es decir que el precultivo se realizó durante
3 días y el cultivo principal también durante 3 días. La con-
centración fungal de células estuvo sustancialmente al mismo
nivel que en la primera marcha de cultivo sacudidor.

15 La tercera marcha de cultivo se continuó ulteriormente de una
manera similar, alcanzando la concentración fungal de célu-
las sustancialmente el mismo nivel que aquel de la primera
marcha del cultivo de sacudida por 2 días de precultivo y 3
días de cultivo principal.

20 Análogamente, la cuarta marcha del cultivo fue realizada -
obteniendo un caldo con concentración fungal de células de
12 g/l más alta que aquella de la primera marcha de cultivo
por 2 días de precultivo y 2 días de cultivo principal.

25 El micelio obtenido no estuvo en la forma de gránulo y per-
maneció disperso en la forma de pulpa, no requiriendo ningún
tratamiento de homogeneización.

30 La célula fungal, según se observó por un microscopio no tu-
vo ninguna conexión de empalme, lo que se encontró en el mi-
celio dicariótico ordinario, y fue alrededor de dos veces ma-
yor en anchura que el micelio dicariótico.

1 De la medición del número de núcleos por el método descrito en el ejemplo 1, se determinó que estas células son todas micelios monocarióticos como se ilustra en una microfotografía de la fig. 3.

5 Cuando el micelio fue cultivado ulteriormente bajo las mismas condiciones que en la marcha previa de cultivo, el micelio propagado estuvo constituido del micelio monocariótico y tuvo todas las propiedades que poseía el micelio monocariótico mostrado en la Tabla 1.

10 También se encontró que el micelio monogariótico fue más de dos veces más alto que en régimen de propagación que el micelio dicariótico.

15 10 gr. del producto seco del micelio monocariótico, obtenido, según el método arriba descrito, fueron extraídos con 300 ml. de agua caliente a 95 hasta 100°C durante 3 horas. La solución de extracto fue concentrada a presión reducida a 30°C y después se añadió con etanol puro para tener la concentración de 90% y el precipitado producido fue secado, obteniendo 0,2 gr. de polvo gris.

20 Un análisis químico de este polvo gris reveló que esta sustancia era un polisacaruro conteniendo nitrógeno de alto peso molecular. Cuando esta sustancia fue administrada a los ratones, transplantados con tipo sólido de Sarcoma 180, demostró una alta actividad anti-tumor.

25 Ejemplo 3:

30 100 ml. de un medio líquido conteniendo 5% de glucosa y 0,75% de extracto de levadura se alimentó en un matraz cónico con capacidad de 500 ml. que ya había recibido adición de 8 gr. de cuentas de vidrio con un diámetro de 2 a 5 mm. y este medio

1 mixto, después de esterificación al calor, fue inoculado con el micelio dicariótico de *coriolus versicolor* (Fr.) Quéll. igual que se empleó en el Ejemplo 1, utilizando un asa de platino y después se sometió a cultivo de sacudida durante 7 días a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5 1 ml. del caldo conteniendo el micelio, así obtenido, fue suministrado al medio, añadido con las cuentas de vidrio, al igual que se ha mencionado arriba y ulteriormente se sometió al segundo cultivo de sacudida durante 6 días.

10 El producto resultante fue ulteriormente sometido a la tercera marcha del cultivo de sacudida durante el periodo de 5 días.

15 El micelio producido por ello no tuvo ninguna conexión de empalme y fue de alrededor de 1,5 veces tan grande en anchura como el micelio dicariótico originado y el resultado de contar núcleos, a la manera del ejemplo 1 reveló que era micelio monocariótico.

20 1 ml. de este caldo fue inoculado en 100 ml. de un medio líquido conteniendo 5% de glucosa y 0,75% de extracto de levadura y no conteniendo ninguna clase de cuentas de vidrio y se cultivó a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. La concentración de micelio, producida 3 días después del comienzo del cultivo, fue de 10,5 g/l., mientras que el resultado de cultivo similar del micelio dicariótico mostró 7 g/l de concentración 4 días después del comienzo del cultivo.

25 Ejemplo 4:

30 100 ml. de un medio líquido conteniendo 5% de glucosa y 0,75% de extracto de levadura se colocó en un matríz cónico de 500 ml. y este medio, después de esterificación al calor, fue inoculado con micelio dicariótico de *coriolus versicolor* -

1 4(Fr.) Quéll, igual que se empleó en el Ejemplo 1, usando e
un asa de platino y después de sometió a cultivo de sacudida
durante 3 días. Después de un tratamiento de homogeneización,
5 la totalidad del fermentador se cubrió con una bolsa de -
polietileno y se cerró herméticamente contra el aire exte-
rior, seguido de 4 días de cultivo.

En el punto de completamiento del cultivo, 50% de gas CO_2
estuvo contenido en la atmósfera del fermentador.

10 1 ml. del caldo, conteniendo el micelio, así producido, fue
inoculado en el medio según la manera de la primera marcha
del cultivo y después se sometió a la segunda marcha del cul-
tivo sacudidor de la misma manera que en la primera marcha.
Tal cultivo fue repetido ulteriormente dos veces. Como resul-
15 tado de la medición de un modo igual al conducido en el Ejem-
plo 1, se determinó que el micelio producido en este proce-
dimiento de cultivo fue todo monocariótico.

Ejemplo 5:

20 El micelio obtenido de cultivo en declive de coriolus versic-
olor (Fr.) Quéll fue ~~que~~ sometido a la determinación
de núcleo siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo
1, por lo que se determinó que todo el micelio es dicarióti-
co y no estuvo presente ningún micelio monocariótico, como
se observó en la fotografía de la fig. 4. Esto indica que
25 el micelio obtenido en esta marcha de cultivo es micelio di-
cariótico.

Este hongo es coriolus versicolor (Fr.) Quéll CM-103 y se de-
positó bajo FERM-P N° 2414 el 25 de diciembre de 1973 en el
30 organismo gubernamental japonés arriba mencionado.

1 100 ml. de medio líquido, conteniendo 5% de glucosa y 0,75%
de extracto de levadura, se colocó en un matraz cónico con
capacidad fr 500 ml. y después de esterilización al calor,
se inoculó con el micelio del *Coriolus versicolor* (Fr) Quéll.
CM-103, usando un asa de platino, seguido de cultivo sacudi-
5 dor durante 7 días a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. El micelio en este cultivo -
fue dicariótico y estuvo contenido a la concentración de 10,8
g/l.
El micelio dicariótico, así obtenido, fue inoculado por 0,01
% en 20 litros de un medio líquido, teniendo disuelto en el
10 mismo 10% de glucosa y 1,5% de extracto de levadura y se sometió
a cultivo sumergido con agitación en un fermentador, ajustado a
 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ usando un agitador del tipo de paletas a la veloci-
dad de 500 r.p.m. Después de 7 días de cultivo, el micelio fue
15 producido a la concentración de 10,2 g/l. en el caldo. 20 ml.
de este caldo fue inoculado en el mismo medio y la segunda
marcha de cultivo se realizó bajo las mismas condiciones du-
rante 6 días. Se repitió ulteriormente un cultivo similar du-
rante 5 días en la tercera marcha y durante 4 días en la cuar-
20 ta marcha.
Después de completar la cuarta marcha de cultivo, el caldo
testuvo en la forma de una pulpa uniforme y contuvo el micle-
lio, producido a la concentración de 11,5 g/l. El micelio no
25 tuvo ninguna conexión de empalme y fue todo micelio monocarió-
tico.
La presente patente de invención recaerá sobre las siguientes
reivindicaciones:
30

REIVINDICACIONES

1
5
10
15
20
25
30

1 - Procedimiento para la obtención de un nuevo micelio monocariótico del hongo *Coriolus versicolor* (Fr.) Qué^l. caracterizado porque un micelio dicariótico de *Coriolus versicolor* (Fr.) Qué^l. primeramente se somete a un tratamiento mecánico en un medio líquido y después se somete a cultivo sumergido, o dicho micelio dicariótico se somete a cultivo sumergido, mientras se realiza dicho tratamiento mecánico sobre dicho micelio.

2 - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho tratamiento mecánico consiste en cizallamiento o molienda por medio de un homogeneizador.

3 - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho tratamiento mecánico consiste en cizallamiento o molienda por medio de un agitador.

4 - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho tratamiento mecánico consiste en molienda por uso de materiales granulares sólidos, inactivos.

5 - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho cultivo sumergido se realiza en un estado altamente nutritivo, utilizando un medio líquido con alta concentración.

6 - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho cultivo sumergido se efectúa en una atmósfera bajo presión parcial reducida de oxígeno.

7 - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho cultivo sumergido se realiza continuamente durante un prolongado periodo de tiempo, mientras se suministra adicionalmente el medio líquido.

1

5

10

15

20

25

30

8 - Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque dichos materiales granulares sólidos inactivos son cuentas de vidrio.

9 - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho cultivo sumergido se efectúa por medio de transferencia sucesiva.

10 - Procedimiento para la obtención de un nuevo micelio - monocariótico del hongo *Coriolus versicolor*.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva y consta de 20 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras y los planos que a la misma se acompañan.

Madrid, a 23 de Agosto de 1977.


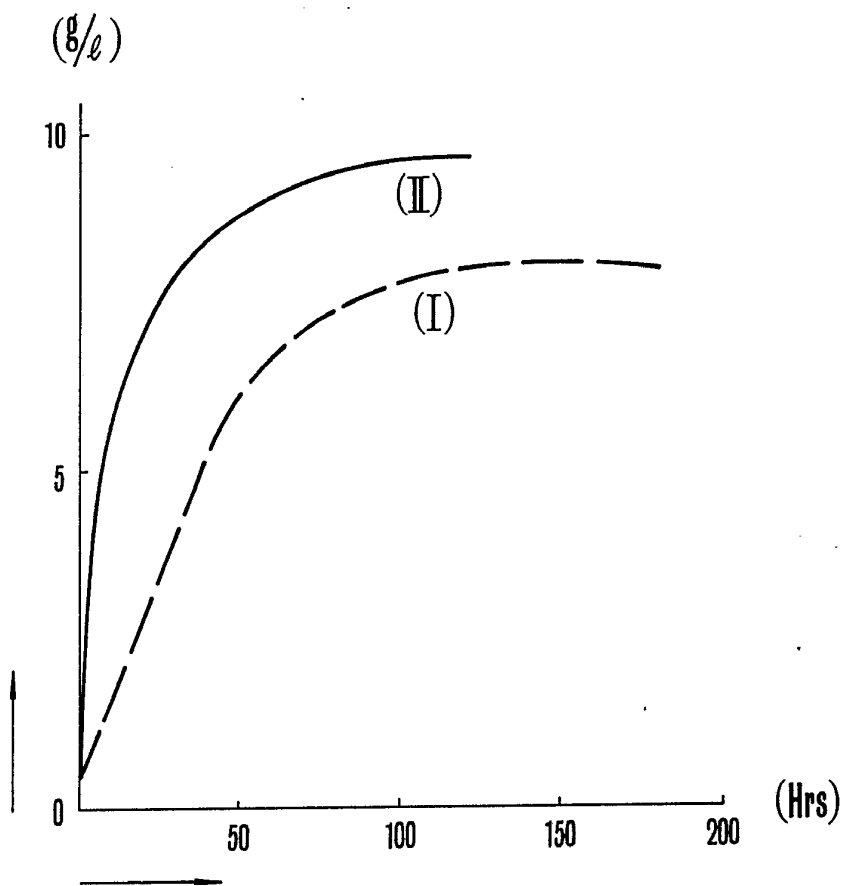
CARLOS ROEB
P. P.

Fdo.: Pedro Matamoros



FIG.1



ESCALA VARIABLE

CARLOS ROEB
P.F.

Fdo: Pedro Matamorón

FIG.2

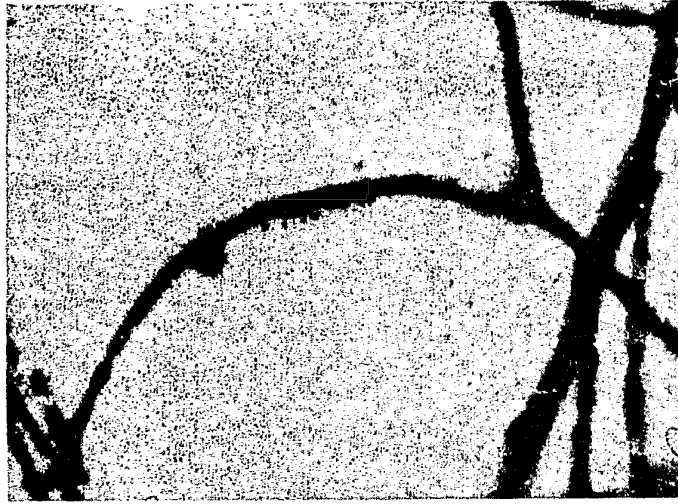
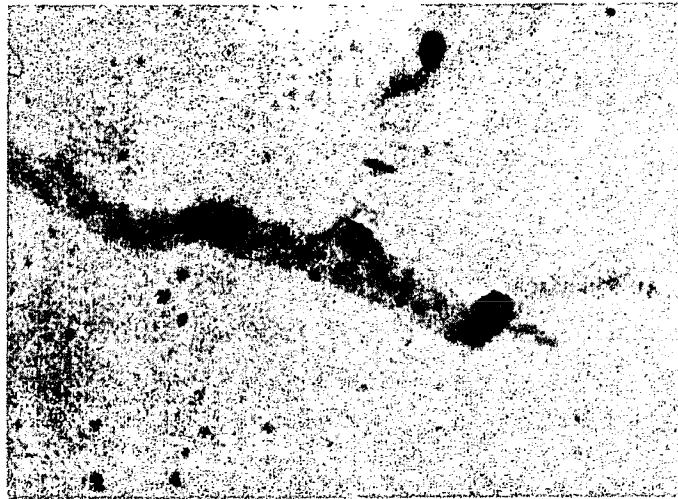


FIG.3



ESCALA VARIABLE

CARLOS FOEB
P. P.

Fdo: Pedro Metamorón

FIG.4



ESCALA VARIABLE

CARLOS ROEB
P. F.

Fdo: Pedro Metamorón