

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010-436**
(22) Přihlášeno: **02.06.2010**
(40) Zveřejněno: **20.10.2010**
(Věstník č. 42/2010)
(47) Uděleno: **13.09.2010**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **20.10.2010**
(Věstník č. 42/2010)

(11) Číslo dokumentu:

302 118

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A01H 13/00 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)
C12P 7/00 (2006.01)
A23D 9/00 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 2008/155410.

Řezanka T. et al.: " Fatty acid composition of six freshwater wild cyanobacterial species, *olia Microbiol.*, 48(1), 71-75, 2003.

(73) Majitel patentu:

Botanický ústav AV ČR, v. v. i., Průhonice, CZ
Institute of Plant Physiology, BAS, Sofia, BG
Institute of Organic Chemistry with Centre of
Phytochemistry, BAS, Sofia, BG
Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, CZ

obsahuje dále 48 % bílkovin, tedy i zbytek po extrakci olejů
je použitelný, např. jako krmivo.

(72) Původce:

Lukavský Jaromír Dr., Třeboň, CZ
Cepák Vladislav Dr., Třeboň, CZ
Řezanka Tomáš Dr., Praha 4, CZ
Petkov Georgi Dr., Sofia, BG
Furnadzhieva Sevdalina Dr., Sofia, BG
Iliev Ivan Mgr., Sofia, BG
Andreeva Rayna Dr., Sofia, BG
Bankova Vassya Dr., Sofia, BG

(74) Zástupce:

Středisko společných činností AV ČR, v.v.i. Patentové a
licenční služby, Národní 3, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Řasa *Trachydiscus minutus*, kmen Lukavský &
Příbyl 2005/1, produkující oleje s vysokým
obsahem více nenasycených mastných kyselin**

(57) Anotace:

Novým perspektivním organismem pro produkci rostlinných
olejů je řasa *Trachydiscus minutus*, kmen Lukavský & Příbyl
2005/1 uložený ve sbírce Botanického ústavu, Třeboň pod
přírůstkovým číslem: 931. Obsah celkových olejů byl v
intenzivně rostoucí kultuře 26 až 39 %, tj. vyšší nežli u
různých rozsivek, kde se udává 10 až 18 %. Podstatné je však
příznivé složení těchto olejů. Z celkového množství olejů tvoří
26 % kyselina myristová a až 42 % EPA (eikosapentaenová
kyselina), obzvláště druhá je žádaným a cenným produktem.
První pro kosmetiku, druhá jako přídavek lidské diety i krmiva
zvířat a v akvakultuře, stejně tak jako také přítomné kyseliny
arachidonová (AA, až 1,7 %) a γ -linoleová (GLA, až 10,7 %).
Poměry mezi kyselinami i celkový obsah lipidů lze měnit
ochuzováním média o N, P, S a kultivačními podmínkami.
Výhodou této řasy je, že snadno a rychle roste v minerálních
médii, dobře snáší mechanické namáhání čerpadlem při
cirkulaci suspenze, snadno se sklízí (kombinací sedimentace a
centrifugace) a suší slunečním světlem na fólii. Jeho biomasa

CZ 302118 B6

Řasa *Trachydiscus minutus*, kmen Lukavský & Příbyl 2005/1, produkující oleje s vysokým obsahem více nenasycených mastných kyselin

5 Oblast techniky

Biotechnologie, potravinové doplňky, akvakultura.

10 Dosavadní stav techniky

Sinice a řasy mají velký potenciál použití v biotechnologii, díky své vysoké růstové rychlosti a možnosti průmyslového pěstování v masových suspenzních kulturách, které jsou snadno technicky ovladatelné. Navíc mohou být instalovány i v lokalitách nevhodných pro klasické plodiny vyžadujících patřičnou půdu. Mikrořasy (především rozsivky – Bacillariophyceae) již byly ověřeny jako potenciální producenti cenných látek, např. více-nenasycených mastných kyselin (PUFA). Tyto esenciální látky jsou nezbytné jako doplněk zdravé lidské výživy i jako přídavek krmení rybám v akvakulturách či zooplanktonu, který potom slouží jako rybí potrava (Borowitzka 1988, *Australian J. Biotechnol.* 1: 58–62, Krienitz et Wirth, 2006, *Limnologica* 36: 204–210).

Významné postavení mezi nimi má EPA (eikosapentaenová kyselina), která již prokázala příznivý vliv na řadu chorob jako jsou mentální a srdeční nemoci, lupénka, imunitní nedostatečnost, záněty a další. Tato látka je hlavním činitelem v příznivém vlivu tzv. středomořské diety (mořské ryby, olivový olej, víno). Působí charakteristickou vůní rybiho masa, samotné ryby ji však netvoří, ale přijímají z mořského fytoplanktonu. Na obr. 1 jsou srovnáni významní producenti EPA (vyjádřeno jako produktivita akumulace). Jsou to především heterokontní řasy *Monodus subterraneus*, *Nannochloropsis* sp. a *Isochrysis galbana*. Z jiných skupin se pěstují mořská rozsivka *Phaeodactylum tricornutum*, mořský haptophyt *Pavlova lutheri*, sladkovodní ruducha *Porphyridium cruentum* a sladkovodní sinice *Arthrospira (Spirulina)* sp. Již je také publikován způsob získávání čisté EPA z heterotrofně kultivované bezbarvé rozsivky *Nitzschia alba* (Kyle et Glaudule, 1993, patent US 5 244 921.) a dále bylo patentováno použití omega mastných kyselin ze sinice *Spirulina* pro léčení zánětů a bolesti. Také další více-nenasycené mastné kyseliny jako arachidonová (AA) či γ -linoleová (GLA) jsou žádané produkty jako přídavky k dietě a medicíně s četnými aplikacemi.

Masová kultivace řas je možná heterotrofně tj. ve tmě na organických substrátech nebo autotrofně s využitím umělého nebo přirozeného světla. Kultivační systémy mohou být uzavřené nebo otevřené. Každý systém má své výhody a nevýhody a je nutno je volit podle organismu i produktu a jeho aplikaci. Pro použití jako přídavku do lidské výživy je nezbytné volit systém zaručující vysokou čistotu látky a bakteriologickou nezávadnost. Detaily kultivačního protokolu jsou obvykle předmětem firemního know-how a nejsou publikovány. Také jen z laboratorních testů lze jen přibližně předpovědět výtěžky v masové venkovní kultuře, kde řada parametrů jen obtížně nebo vůbec není regulovatelná, především světlo a teplota.

Celkový obsah olejů, jejich složení a proporce jednotlivých PUFA se u různých řas velmi liší (obr. 2) a u některých prací jsou údaje jen fragmentární. Obsah celkových olejů v rozsivkách je udáván od 10 až do 18 % v sušině, v sinici *Spirulina* 9,4 až 16,3 %, nejvíce v zelené řase *Botryococcus* sp. 19,8 % (Shen et al. 2008, *Trans. ASABE* 51: 1395–1400). Při studiu složení olejů u deseti druhů řas byl nalezen vyšší obsah EPA pouze u 3 druhů a to *Nitzschia ovalis* (23,7 %), *Thalassiosira* sp. (11,3 %) a *Tetraselmis* sp. (4,1 %) (Pratoomyot, Srivilas, et Noiraksar, 2005, *Songklanakar J. Sci. Technol.* 27: 1179–1187).

Obsah EPA u komerčně pěstované řasy *Monodus subterraneus* dosahuje v závislosti na podmínkách kultivace 20 až 37 % z celkových mastných kyselin, u *Nannochloropsis limnetica* 5,6 % v biomase (Krienitz et Wirth, 2006, *Limnologia* 36: 204–210).

- 5 Dosud nejproduktivnějšími řasami pěstovanými pro získávání olejů, tj. *Monodus subterraneus* a *Pavlova lutheri* aj. druhy (Wen & Chen, 2003) u kterých z celkového obsahu olejů tvoří kyselina myristová 26 % a EPA až 42 % z celkových lipidů (obr. 1 a 2).

Mastné kyseliny jsou cenné produkty, obvykle však jednotlivé organismy silně produkují jen jednu z nich. Sinice obsahují převážně kyselinu myristovou, v rozsivkách je převažující EPA. Pouze obsah žádaných látek není však jedinou podmínkou úspěšnosti biotechnologické produkce. Organismus pro venkovní kultivace musí snadno růst v daném zařízení, musí mít určitou odolnost proti technologickému zacházení (např. čerpání), oscilacím teploty a intenzity světla atd. Proto se neustále hledají a testují nové organismy i různé typy kultivátorů. Heterotrofní kultivace mají výhodu v tom, že nejsou závislé na počasí a sezóně. Vyžadují však drahé fermentory udržující konstantní teplotu a organické látky v médiu vč. vitaminů. Jsou proto velice náchylné ke kontaminaci bakteriemi a plísněmi. Z těchto důvodů jsou zpravidla nákladnější nežli autotrofní kultivace využívající jednoduchá anorganická média a sluneční energii (světlo i teplo). Proto je perspektivní hledat organismus, který by rostl autotrofně, byl schopen kultivace v otevřených systémech a byl dostatečně resistantní proti kontaminaci jinými řasami, sinicemi i bakteriemi. Navíc zde Slunce dodává svoji čistou energii zdarma.

Literatura

- 25 Kambourova, R., Bankova, V., & Petkov, G. (2003): Volatile substances of green alga *Scenedesmus incrassatulus*. – Z. Naturforsch. 58: 187–190.

Krienitz, L., & Wirth, M. (2006): The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. – *Limnologia* 36: 204–210.

Liu, C. P. & Lin, L. P. (2005): Morphology and eicosapentaenoic acid production by *Monodus subterraneus*. – *Micron* 36: 554–550.

- 35 Petkov, G., & Ramazanov, Z. (2003): Fatty acids and sterols of *Griffonia* seeds oil. – *Grasas y Aceites* 54: 30–31.

Vazhappilly, R., & Chen, F. (1998): Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. – *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 75: 393–397.

40 Wen, Z.-Y. & Chen, F. (2003): Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. – *Biotechnol. Advances* 21: 273–294.

45 Podstata vynálezu

Řasa *Trachydiscus minutus* (Bourrelly) Ettl, (dále jen *T. minutus*) se vyskytuje v mnoha biotopech jako jsou jezera, rašeliniště, drobné vodní tůně, mrtvá ramena řek atd., ale nikde v přírodě není hojná. Z chladicího bazénu jaderné elektrárny Temelín, kde dva roky dominovala ve fytoplanktonu, byla v r. 2005 izolována roztěrem na agarovou plotnu se Z médiem (obr. 9) a výběrem jedné kolonie. Je uložena ve sbírce Botanického ústavu AV ČR, Dukelská 135, Třeboň jako kmen Lukavský & Příbyl 2005/1). *T. minutus* není dosud udržován v žádné jiné, ani světové řasové sbírce. Tuto řasu je možno snadno identifikovat i jen ve světelném mikroskopu, charakteristické znaky jsou žlutozelená barva chromatoforů, pravidelně strukturovaná buněčná stěna a velká

centrální oranžová olejová kapka (obr. 3, 4, 5). Tím se odlišuje od morfologicky velmi podobné a hojně řasy zelenivky (*Chlorella*).

T. minutus je novým perspektivním organismem pro produkci olejů. Patří do odd. Heterokontophyta, tř. Eustigmatophyceae (spolu s tř. Bacillariophyceae, rozsivky), kde u obou tříd jako zásobní látka slouží olej. Obsah celkových olejů v biomase intenzivně rostoucí kultury *T. minutus* je 26 % v sušině (v médiu bez N a S až 39 %), obsah EPA tvoří 27 až 42 % celkového množství lipidů. Poměr EPA k celkovým lipidům je porovnatelný s komerčními kmeny, ale kmen *T. minutus* produkuje lipidů významně vyšší množství a tudíž reálné množství produkované EPA v *T. minutus* je mnohem vyšší.

U *T. minutus* a možno dále obsah EPA regulovat kultivačními podmínkami (obr. 6). Také další přítomná kyselina gama-linoleová (GLA), které může být až 10,7 % (obr. 6) má četné aplikace. *T. minutus* snadno a poměrně rychle roste v běžných minerálních médiích používaných jak v laboratořích i v řasové biotechnologii. Použitím médií ochuzených o základní živiny (N,S,P) či ředěných např. na 1/2 je možno účinně regulovat složení biomasy (obr. 6). Výtěžek dosáhl v laboratorních podmínkách až 14 g sušiny na litr média (obr. 7). Biomasa se dobře sklízí (kombinace sedimentace a následně odstředění). Optimální teplota v testované v laboratorních kulturách je 27 °C (obr. 8). Kolem této hodnoty přirozeně kolísá i teplota při kultivaci ve venkovních podmínkách, proto je tato řasa vhodná pro pěstování v mírném pásmu (Příklad 2) i ve Středomoří (Příklad 1). Buňky obsahují 48 % bílkovin, tedy i zbytek po extrakci olejů je použitelný, např. jako krmivo.

25 Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1: Srovnání produktivity akumulace EPA u různých řas pěstovaných za různých podmínek, podle Wen & Chen 2003. ^aotevřený rybníček v zimě, ^botevřený rybníček v nejlepších podmínkách, ^cmixotrofní růst, ^dheterotrofní růst.

Obr. 2: Obsahy lipidů a jejich složek v různých řasách a sinicích (TAG = acylglyceroly, EPA = eicosapentaenová kys. MYR = kys. myristová).

Obr. 3: *T. minutus* ve světelném mikroskopu s charakteristickou, pravidelně tečkovanou buněčnou stěnou. Měřítka = 10 μm.

Obr. 4: *T. minutus* ve světelném mikroskopu s charakteristickou velkou centrální oranžovou olejovou kapkou. Měřítka = 10 μm.

Obr. 5: Mikrofotografie řasy *T. minutus* kmen Lukavský & Příbyl 2005/1 při fluorescenčním režimu osvětlení (vlevo) a v procházejícím světle (vpravo). Červená barva je autofluorescence chlorofylu v ultrafialovém světle a velké žlutobílé globule uprostřed buňky jsou lipidy. Měřítka = 10 μm.

Obr. 6: Celkové lipidy a složení mastných kyselin (%) v řase *T. minutus* pěstované v různě modifikovaném médiu SŠ (v originální koncentraci, ředění na 1/2, ochuzovaných o živiny N, S a, N i S). Plošinový kultivátor (viz obr. 7) ve skleniku BÚ AV ČR v Třeboni. Kultivační podmínky a metoda identifikace mastných kyselin viz. příklad 2.

Obr. 7: Fysiologické charakteristiky řasy *T. minutus*. Laboratorní kultivace ve velkých zkumavkách objemu 200 mL, aerace vzduchem s 2 % obj. CO₂, teplota 28 °C. Řasa intenzivně přijímá fosfáty a nitráty. Po jejich vyčerpání následuje rychlá akumulace olejů až do koncentrace 25 % v sušině.

Obr. 8: Vliv teploty na růst řasy *T. minutus* po 96 h kultivace v laboratorním kultivátoru (kultivační podmínky viz Příklad 3), optimální teplota je 27 °C.

Obr. 9: Tabulka složení zásobních roztoků pro přípravu média Z8 podle Zehnder in Staub (1961):
Do 700 mL destilované vody přidáme po 10 mL jednotlivých makroelementů ze zásobních roztoků, 0,2 ml Fe-EDTA roztoku, 0,08 mL Gaffronova roztoku mikroelementů a doplnit destilovanou vodou na 1L.

Obr. 10: Plochá okrouhlá vana s vyšší vrstvou suspenze (15 až 20 cm) míchaná pádlovým kolem ve skleníku fy Algae, Therma, Nigrita, severní Řecko, Kultivační podmínky viz Příklad 1. Identifikace mastných kyselin byla prováděna metodou GC-MS (viz obr. 12).

Obr. 11: Složení biomasy řasy *T. minutus*, napěstované v laboratoři (viz. Příklad 3) a v poloprodučním kultivátoru (Příklad 1). Mastné kyseliny byly analyzovány tenkovrstvou chromatografií (TLC).

^a Průměrné hodnoty a standardní odchylka z 8 pokusů stanovení mastných kyselin u kultivací v laboratoři, při 20 až 35 °C, osvětlení 35 W.m⁻², ^b kultivace v poloprodučním kultivátoru (viz obr. 8) ve skleníku, Nigrita, Řecko, kultivační podmínky viz. Příklad 1. st. = stopy, myristová kys = 14:0, γ -linoleová kys. = γ -18:3, EPA = 20:5, AA = 20:4. Obsahy jednotlivých mastných kyselin jsou počítány z celkových lipidů nebo jen z triacylglycerolů.

Obr. 12: Kultivační zařízení vyzkoušené pro řasu *T. minutus*, plošinový kultivátor využívající tenkou řasovou vrstvu (kolem 5mm) a velmi husté suspenze, která se míchá a provzdušňuje čerpadlem, do kterého se také dává CO₂. Kultivační médium SŠ (obr. 13). Tato kultivace proběhla ve skleníku Botanického ústavu AVČR v Třeboni, tj. v klimatických podmínkách střední Evropy.

Obr. 13: Tabulka složení media SŠ (Simmer/Šetlík), podle Zachleder & Šetlík (1982): v 700 mL destilované vody rozpustíme postupně následující látky v koncentracích v mg.L⁻¹, a doplníme destilovanou vodou na 1L.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava inokula

Platí i pro Příklad 2 a 3: *T. minutus*, je uchováván ve sbírce (CCALA Třeboň) jako rostoucí kultura ve zkumavce na šikmém agaru při 15 °C, pod zářivkovým osvětlením 10 W.m⁻². Z ní byl kmen předpěstován vsádkovou, stacionární kultivací na kapalném médiu Z8 (obr. 9) v Erlenmyerových baňkách, s obsahem 5L nejdříve s 0,25L média, a postupně (po zhoustnutí) je objem doplněn na 0,5L a nakonec na 2L média. Míchání je potřepáním 3x denně, expozice pod zářivkovým kobercem, při nepřetržitém osvětlení FAR (fotosynteticky aktivní radiace, tj. 400 až 700 nm) 40 W.m⁻² a teplotě 25 °C. Na začátku kultivace a po každém zvýšení objemu byla intenzita světla na prvních 5 dní snížena na 20 W.m⁻² dokud kultura viditelně nezhoustla.

Poloproduční kultivace v Řecku

Poloprodučně byla *T. minutus* pěstován v okrouhlém 330 litrovém kultivátoru ve skleníku, s osvětlenou plochou 2 m², s nepřetržitým mícháním pádlovým kolem, vč. noci (obr. 10). Kultivačním médiem bylo Z8 (obr. 9), v 3násobné koncentraci. Inokula bylo dodáno do poloprodučního kultivátoru tolik, že koncentrace řas v médiu na začátku kultivace byla 0,12 g.L⁻¹. Kultivace

byla prováděna v klimatických podmínkách SV Řecka (Nigrita) kde byla intenzita světla v maximum 220 W. m⁻² FAR, CO₂ byl do média dodáván perforovanou hadičkou stočenou na dně vany a regulován tak, aby pH bylo udržováno kolem hodnoty 8,5. Např. pátý den kultivace, 7.VI. v 7:30 bylo 8,5 ve 12:30 pak 9 a v 15:00 bylo 9,13. Přes noc byl vždy přívod CO₂ zastaven
 5 Teplota suspenze se měnila v průběhu intenzity světla během dne, např. opět 7.VI. v 7:30: 26,5 °C; ve 12:30: 33 °C a v 15:00: 34 °C. Kultivace probíhala 13 dní (2. – 15. VI. 2008) v normálním denním rytmu a biomasa dosáhla hodnoty 1,5 g.L⁻¹, výtěžek tedy byl 19 g.m⁻².den⁻¹, 0,12 g.L⁻¹.den⁻¹. Po 13 dnech kultivace byla biomasa sklizena průmyslovou průtokovou odstředivkou při 3000 g, doba zdržení byla regulována průtokem tak, aby odcházející médium bylo bez viditelného zákalu. Hustá pasta byla rozprostřena ve vrstvě silné 2 mm na plastové fólii a sušena
 10 ve skleníku Sluncem po dobu 1 dne. Způsob analýzy olejů viz Příklad 3, složení olejů, je uvedeno v tabulce (obr. 11).

Příklad 2

Masová kultivace v Třeboni

Byla ověřena i ve zcela jiném typu kultivátoru umístěného ve skleníku Botanického ústavu v Třeboni (obr. 12). Má skleněnou šikmou plochu o délce 12 m a šířce 1 m, spád 15 cm, objem
 20 140 L. Tento typ je určen pro velmi husté suspenze v tenké vrstvě (10 mm). Rozpěstování ze sbírkové kultury bylo stejné jako u Příkladu 1. Inokulum bylo napěstováno v Erlenmayerových baňkách (shodně jako u příklad 1) a poté dále namnoženo kultivací v planoparalelní kyvetě s obsahem 12 L, na médiu SŠ (obr. 13) z boku osvětlené zářivkami s nepřetržitým osvětlením dávajícím hodnotu FAR 80 W.m⁻². Aerace byla zajištěna probubláváním perforovanou hadičkou na dně
 25 kyvety s průtokem 0,5 L.min⁻¹ směsí vzduch s 2 % obj. CO₂. Ze začátku byla intenzita světla snížena po 3 dny na 40 W. m⁻² dokud kultura viditelně nezhoustla.

Narostlé inokulum bylo převedeno celé do 130 L média SŠ (obr. 13). Pro ovlivnění metabolických procesů v buňce byla připravena i média SŠ ředěná na polovinu a dále varianty bez S, a bez
 30 S i N. Výsledky jsou v obr. 6.

Počáteční koncentrace řasy *T. minutus* byla v kultivační plošině po naočkování 0,5 g.L⁻¹. Na začátku kultivace (10. III. 2009) byla intenzita světla v poledne 200 W.m⁻² FAR. Pokud intenzita denního světla byla pod 15 W.m⁻² (silně zataženo) řasy byly uchovávány v zásobníku s aerací
 35 vzduchem a nebyly čerpány na plošinu. Do média byl dávkován CO₂ zavedením do odstředivého čerpadla pro rychlé vstřebání suspenzí řas a jeho koncentrace byla regulována na 5 L.h⁻¹. Teplota suspenze kolísala v rozmezí 12 až 25 °C (ráno–odpoledne). Narostlá biomasa byla po 16 dnech (1.–16.III.2009) sklizena sedimentací a následným odstředěním v laboratorní odstředivce (20 min. při 3000 g), zmrazena na –20 °C a později lyofilizována (vakuové odmražení, při
 40 tlaku 0,05 hPa). Hustota suspenze na konci kultivace byla 4,8 g.L⁻¹ (sklizeno bylo celkem 672 g sušiny, tj. 56 g.m⁻² neboli 2,8 g.m⁻².den⁻¹, nebo 0,3 g sušiny.L⁻¹.den⁻¹. Při obsahu EPA 7,2 až 13 % v sušině to je produkce 20 až 30 mg.L⁻¹.den⁻¹), což je srovnatelné s výtěžky dosavadních producentů, počítáno na litr kultury (obr. 1). Přitom vyšší hodnoty byly dosaženy jen u laboratorních, uzavřených systémů kultivace, zatímco naše zařízení bylo sice ve skleníku, ale typu otevřeného
 45 plošinového kultivátoru. Pokud počítáme výtěžek na m² pak byl náš výtěžek 200 až 300 mg.m².den. Mikroskopický rozbor prokázal, že řasa dobře snáší mechanické namáhání odstředivým čerpadlem, počet mechanicky rozbitých buněk byl pod 1 %. Další výhodou je, že rostla v běžných typech kultivátorů, které se již běžně používají pro komerční produkci biomasy sinic (Spirulina – příklad 1) i řas (Chlorella – příklad 2).
 50

Identifikace mastných kyselin: 100 mg lyofilizované biomasy bylo zmýdelněno 10% roztokem KOH v metanolu při pokojové teplotě přes noc. Neutrální a bazické sloučeniny byly z roztoku o pH 9 vytřepány diethyletherem a vodný roztok s mastnými kyselinami byl okyselen na pH 2
 55 a kyseliny byly extrahovány do hexanu. Mastné kyseliny byly methylovány směsí BF₃–methanol

a identifikovány pomocí GC-MS (plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, s iontovou pastí s detektorem s ionizací nárazu elektronů). Vzorek byl nastříknut do kapilární kolony s polární stacionární fází, 25 m × 0,25 mm × 0,1 μm a pro eluci byl použit teplotní gradient 5 min při 50 °C, zahřívání kolony rychlostí 10 °C min⁻¹ do 320 °C a izotermicky 15 min při 320 °C. Nosným plynem bylo He s průtokem 0,52 mL.min⁻¹. Všechna spektra byla skenována v rozsahu 50 až 600 Da. Struktura methyl esterů byla určena na základě retenčních časů, jejich fragmentace a srovnáním spekter se spektry čistých látek. Koncentrace jednotlivých mastných kyselin produkovaných za rozdílného složení médií jsou na obr. 6.

Příklad 3

Laboratorní kultivace

Složení biomasy řasy *T. minutus* napěstované v laboratorním kultivátoru v Sofii. V laboratoři byl *T. minutus* jak v inokulační tak v experimentální fázi kultivován v zařízení skládajícího se z vodní lázně s průhlednými stěnami s nepřetržitým osvětlením z boku, zářivkami dávajícími ozáření 35 W m⁻² FAR, nižší hodnoty byly získány odstíněním neutrálními filtry z černých kovových sítí různé hustoty. Teploty (20 až 35 °C) byly udržovány pomocí cirkulace vody z ultratermostatu. Kultivační nádoby byly velké zkumavky s obsahem po 200 mL s okrouhlým dnem. Příprava inokula byla shodná s Příkladem 1. Aerace kultur byla probubláváním trubičkou na dno zkumavky, průtokem 3 mL.s⁻¹ vzduchu s 0,5 % obj. CO₂, tím bylo udržováno pH na 7,5. V obou fázích bylo použito kultivační médium Z8. Počáteční koncentrace kultury byla nastavena na 0,2 g.L⁻¹ sušiny a kultura dorostla do hodnoty 3,5 g.L⁻¹.

Sušina biomasy: byla stanovena centrifugací 10 mL vzorku 20 min při 3000 g, ve skleněných, předvážených a vysušených centrifugačních zkumavkách. Sediment byl jednou promyt destilovanou vodou, znovu centrifugován a vysušen při 105 °C do konstantní váhy a zvážen.

Izolace mastných kyselin: 2 g čerstvé biomasy byly extrahovány směsí chloroform/methanol 2:1, 3x po 0,5 h pod refluxem. Extrakt byl odpařen ve vakuu a zbytek byl re-extrahován chloroformem pro gravimetrické stanovení celkových lipidů. Hlavní skupiny lipidů byly odděleny preparativní tenkovrstevnou chromatografií (TLC) následovně: triacylglyceroly (TAG) směsí hexan/diethyl ether 3:1; glycol-, sulfo- a fosfolipidy směsí chloroform/methanol/voda 65:25:4. Množství triacylglycerolů bylo stanoveno vážením po odpaření směsi hexan/diethyl podle Petkov a Ramazanov (2003). Z celkových lipidů bylo 50 mg vzorku esterifikováno zahříváním se stejným objemem methanolu s 6 % bezvodé HCl při 60 °C po dobu 1,5 h. Vzniklé methylestery mastných kyselin byly extrahovány hexanem a čištěny TLC na silikagelu směsí hexan/diethyl ether 10:1.

Identifikace mastných kyselin: Mastné kyseliny byly identifikovány pomocí plynové chromatografie. Methyl estery mastných kyselin byly nastříknuty do kapilární kolony (30m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm) s polární stacionární fází, a pro eluci byl použit teplotní gradient od 40 do 280 °C, rychlost 6 °C min⁻¹. Nosným plynem bylo He s průtokem 15 mm³.s⁻¹. Teplota plamen-ionizačního detektoru byla 250 °C. Pro všechny kroky postupů byly použity chemikálie p.a. kvality, destilovaná voda a celoskleněné systémy.

Výsledky jsou v obr. 11.

^a Průměrné hodnoty a standardní odchylka z 8 opakování stanovení mastných kyselin v laboratoři, při 20 až 35 W.m⁻², ^b kultivace v okrouhlém poloprovozním kultivátoru ve skleníku, Alga, Therma, Nigrita, Řecko, kultivační podmínky poloprovozní kultivace viz Příklad 1. st. = stopy. Myristová kys. = 14:0, γ-linoleová kys. = γ-18:3, EPA = 20:5, AA = 20:4. Obsahy jednotlivých mastných kyselin jsou počítány z celkových lipidů a nebo jen z triacylglycerolů.

Průmyslová využitelnost

5 Řasová biotechnologie, produkce PUFA jako přídatku diety člověka i zvířat, krmiva pro ryby
a zooplankton v akvakulturách, kosmetika.

10

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Řasa *Trachydiscus minutus*, kmen Lukavský & Přibyl 2005/1, produkující oleje s vysokým
obsahem více nenasycených mastných kyselin, uložený ve sbírce Botanického ústavu, Třeboň
15 pod přírůstkovým číslem: 931.

20

7 výkresů

Obr. 1

Organismus	Kultivační jednotky	Způsob kultivace	EPA, produkce (mg.L ⁻¹ .den ⁻¹)	Autor
<i>Porphyridium cruentum</i>	rybníček ^a	zima	0.5	Ratlidge 1997
<i>Porphyridium cruentum</i>	lahve	vsádková	3.6	Akimoto et al. 1998
<i>Isochrysis galgana</i>	skleněné potrubí	semi-kontinuální	4.6	Otero et al. 1997a
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	skleněné potrubí	semi-kontinuální	5.2	Otero et al. 1997b
<i>Nannochloropsis oculata</i>	?	vsádková	5.5	Sukenik et al. 1989
<i>Isochrysis galgana</i>	fermentory	kontinuální	7.2	Grima et al. 1993
<i>Porphyridium cruentum</i>	rybníček ^b	optimal weather	8.0	Ratlidge 1997
<i>Isochrysis galgana</i>	fermentory	kontinuální	15.3	Grima et al. 1994
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	skleněné potrubí	vsádková	19.0	Yongmanitchai and Ward 1991
<i>Isochrysis galgana</i>	cyindrický fermentor	kontinuální	23.8	Sevilla et al. 1998
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	skleněný tank	kontinuální	25.1	Yongmanitchai and Ward 1992
<i>Monodus subterraneus</i>	erlenmeyerovy lahve	semi-kontinuální	25.7	Cohen 1994
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Trubicový fotobioreaktor	kontinuální	32.0	Zittelli et al. 1999
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	skleněná nádoba ^c	vsádková	33.5	Garcia et al. 2000
<i>Monodus subterraneus</i>	šnekovitý trubicový fotobioreaktor	semi-kontinuální	56.0	Lu et al. 2001
<i>Monodus subterraneus</i>	plochý plate reaktor	semi-kontinuální	58.9	Qiang et al. 1997
<i>Nitzschia laevis</i>	fermentor ^d	průtoková	174.6	Wen and Chen 2001

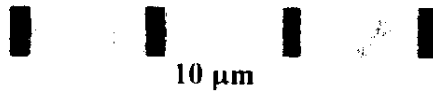
Obr. 2

Organismus	Lipidy		TAG		MYR		EPA		Autor
	%	v	%	v	%	v	%	v	
	sušině	sušině	lipidech	lipidech	lipidech	lipidech	lipidech	lipidech	
<i>Chlorella protothecoides</i>	53								Cheng et al 2009
<i>Navicula</i> sp.	17-18								Řetovský 1946
<i>Spirulina</i> sp.	9,4								Arvanitis et al. 2003
<i>Spirulina</i> sp.	16,3								Ramadan et al. 2008
<i>Botryococcus braunii</i>	19,8								Shen et al. 2008
Bacillariophyceae	10								Harder & Witch 1942
<i>Scenedesmus obliquus</i>	12,7								Mandal & Mall
12 kmenů Cyanobacterii	8-13								Vargas et al. 1998
<i>Nitzschia ovalis</i>					3,1		26,7		
<i>Thalassiosira</i> sp.					6,4		16,6		
<i>Tetraselmis</i> sp.					1,2		4,7		Pratoomyot et al. 2005
<i>Synechocystis</i> sp.					28,2		-		
<i>Synechococcus</i> sp.					26,7		-		
<i>Anacystis</i> sp.					4,9		-		
<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>							5		Schmid-Staiger & Trosch 2009
<i>Nannochloropsis</i> sp.							25		Sukenik 1991
<i>Pavlova lutheri</i>							32,8		Meireles et al. 2003
<i>Monodus subterraneus</i>							31-34		Liu & Lin 2005
<i>Monodus subterraneus</i>	11						31,8		Lu & al. 2001
<i>Monodus subterraneus</i>							34,2		
<i>Chlorella minutissima</i>							31,3		Vazhappilly & Chen, 1998
<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>							21,4		
<i>Monodus subterraneus</i>							36,7		Cohen 1994
<i>Trachydiscus minutus</i>	26-31	20			26		27-42		předmět vynálezu

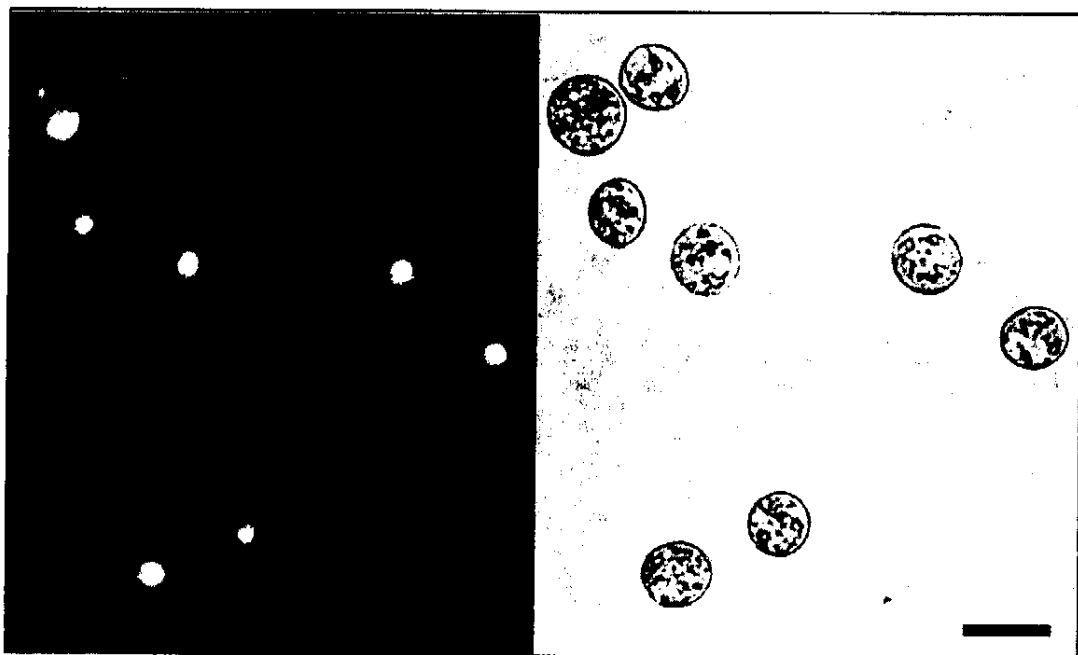
Obr. 3



Obr. 4



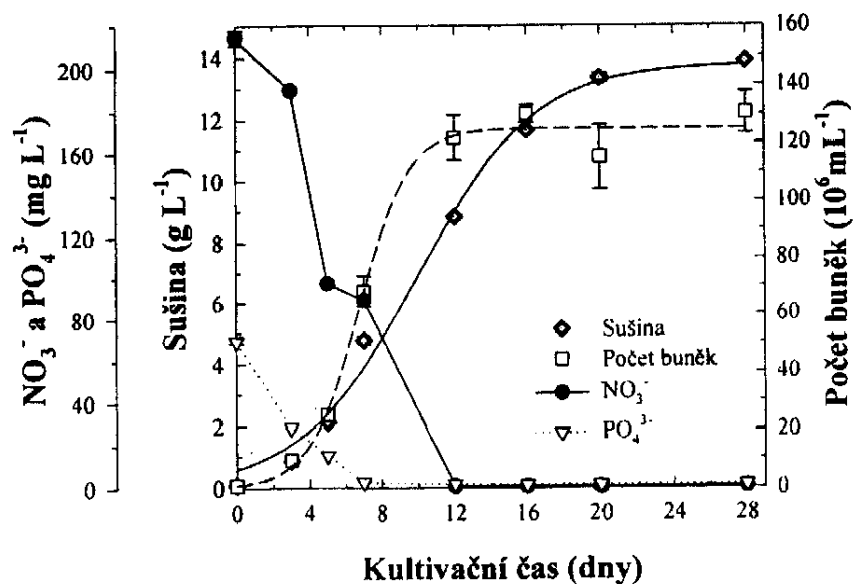
Obr. 5



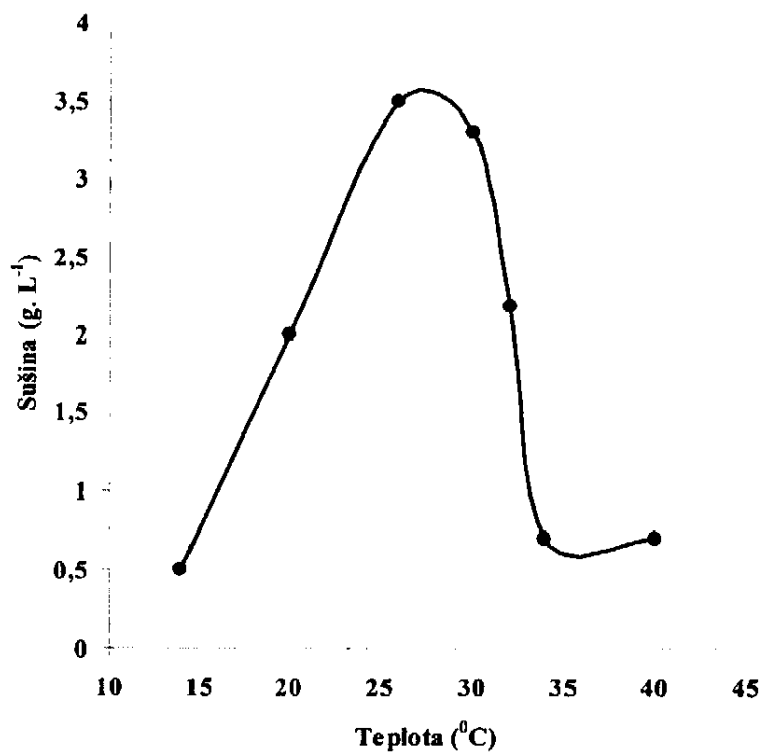
Obr. 6

Příklad 2	Medium SŠ 1/2	Medium - S	Medium - S a - N	Medium SŠ
Celk. lipidy (%)	28	33	39	30
Mastné kyseliny, % v celkových lipidech				
14:0	26.6	41.8	47.1	53.5
16:1 ω -7	11.6	13.0	10.5	8.6
16:0	11.7	17.5	17.2	15.0
18:2 ω -6	6.7	6.7	5.4	2.8
18:3 ω -3	5.9	10.7	7.7	3.8
20:4 ω -6	1.7	0.6	0.6	0.9
20:5 ω -3	35.8	9.7	11.5	15.4

Obr. 7



Obr. 8.

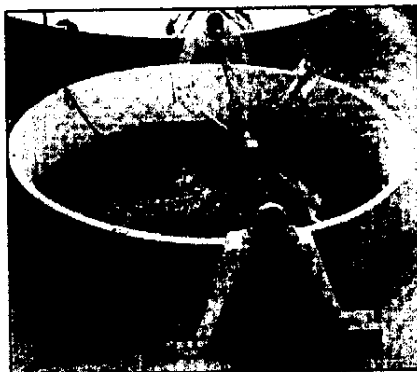


Obr. 9

Makroelementy, g.L ⁻¹		Gaffronův roztok mikroelementů, mg.100mL ⁻¹			
NaNO ₃	46,7	NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O	19,8	KBr	11,9
Ca(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	5,9	V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ .16H ₂ O	3,1	H ₃ BO ₃	31
K ₂ HPO ₄	3,1	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	8,8	MnSO ₄ .4H ₂ O	223
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5	ZnSO ₄ .7H ₂ O	28,7	Cr(NO ₃) ₃ .7H ₂ O	3,70
Na ₂ CO ₃	2,1	Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	15,4	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	14,6
		Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ .24H ₂ O	47,4	KJ	8,3
		Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	3,3	CuSO ₄ .5H ₂ O	12,5

Fe-EDTA roztok (do 500 mL): 0,138 mg FeCl₃.6H₂O in 5ml 0,1N HCl + 0,186mg Chelaton III v 5mL 0,1N HCl

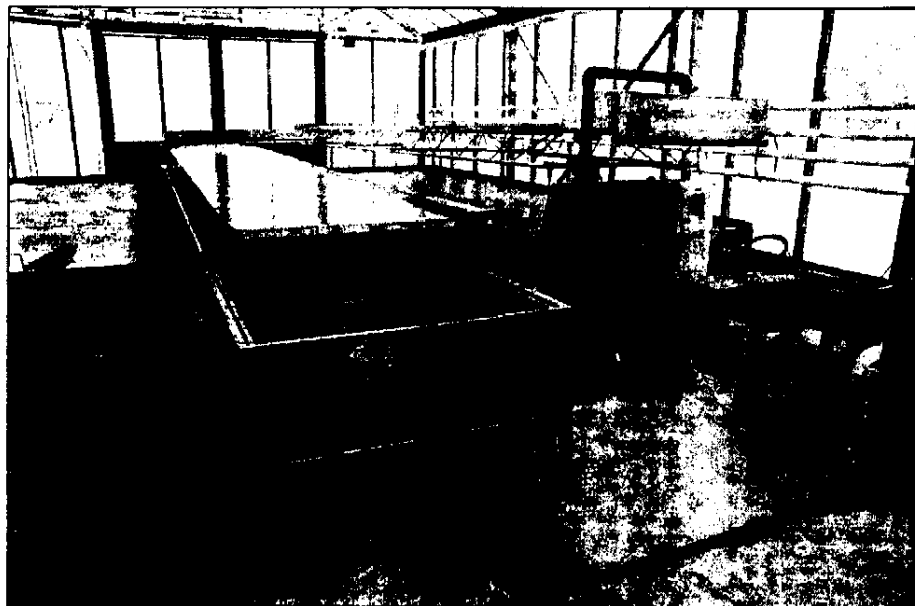
Obr. 10.



Obr. 11

Mastné kys.	Mastné kyseliny, % (v celkových tucích).				Mast. kys., % v triacylglycerolech
	Příklad 3 Laboratorní kultury		Příklad 1 Řecko, poloprovoz,		Příklad 3 Lab. kultury
	26 °C		20-35 °C	23-34 °C	26 °C, 35 W m ⁻²
	18 W m ⁻²	35 W m ⁻²	^a 35 W m ⁻²	^b max 220 W m ⁻²	35 W m ⁻²
12:0	st.	0.8 ± 0.4	1.2 ± 0.5	0.6 ± 0.5	1.2 ± 0.1
14:0	28 ± 6	28 ± 3	26 ± 5	4 ± 2	20.3 ± 0.1
16:0	10 ± 2	8 ± 1	9 ± 4	33 ± 13	13.8 ± 0.9
16:1	5 ± 1	10 ± 3	10 ± 3	6 ± 1	14.8 ± 0.9
16:2	st.	0.8 ± 0.3	1.5 ± 1	4 ± 2	0.8 ± 0.1
18:0	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.5	3 ± 1	3.7 ± 0.4
18:1	3 ± 1	3 ± 0.5	3 ± 2	9 ± 3	9.9 ± 0.8
18:2	5 ± 1	7 ± 1	7 ± 1	23 ± 7	11.9 ± 0.5
γ-18:3	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.4	0.3 ± 0.3	st.
A-18:3	2 ± 1	7 ± 2	5 ± 3	6 ± 2	5.5 ± 0.3
20:4	4 ± 1	6 ± 1	6 ± 2	4 ± 2	10.7 ± 0.9
20:5	42 ± 6	27 ± 4	29 ± 7	3 ± 1	7.4 ± 0.8

Obr. 12.



Obr. 13

Makroelementy	mg.L ⁻¹	Mikroelementy	mg.L ⁻¹
KNO ₃	4042	H ₃ BO ₃	3,09
Ca(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	5,9	MnSO ₄ .4H ₂ O	1,18
KH ₂ PO ₄	340	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1,4
MgSO ₄ .7H ₂ O	988	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,43
CaCl ₂ .6H ₂ O	10,96	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,88
Fe/Na-EDTA	18	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,24

Konec dokumentu
