

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

306 738(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A01H 13/00 (2006.01)*C12N 1/12* (2006.01)*C12P 7/64* (2006.01)(19)
ČESKÁ
REPUBLIKAÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-340**
 (22) Přihlášeno: **07.06.2016**
 (40) Zveřejněno: **31.05.2017**
(Věstník č. 22/2017)
 (47) Uděleno: **19.04.2017**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **31.05.2017**
(Věstník č. 22/2017)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 2015/142 705 A1; CN 105 296 553 A; CN 104611228 A.

(73) Majitel patentu:
 Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i., Praha 4, CZ
 Botanický ústav AV ČR, v.v.i., Průhonice, CZ

(72) Původce:
 RNDr. Tomáš Řezanka, CSc.DSc., Praha, CZ
 RNDr. Jaromír Lukavský, CSc., Třeboň, CZ
 RNDr. Linda Nedbalová, Ph.D., Třeboň, CZ

(74) Zástupce:
 PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Husova 5,
 370 01 České Budějovice

(54) Název vynálezu:

**Produkční kmen řasy *Monoraphidium* sp.
 pro produkci olejů s obsahem
 polynenasycených mastných kyselin, způsob
 produkce těchto olejů a použití tohoto
 produkčního kmene pro průmyslovou
 výrobu těchto olejů**

(57) Anotace:

Produkční kmen řasy *Monoraphidium* sp. uložený ve Sbírce autotrofních organismů Botanického ústavu AV ČR, Třeboň, Dukelská 135, pod přírůstkovým číslem CCALA 1094: *Monoraphidium* sp. Nedbalová 2009/1 je využitelný jako zdroj pro průmyslovou produkci olejů s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny hexadekatetraenové a kyseliny stearidonové pro doplňky stravy člověka, zvířat či jako použití pro jiné aplikace. Vynález popisuje také způsob produkce olejů s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin v produkčním kmene, spočívající v jeho vystavení nízkým kultivačním teplotám.

CZ 306738 B6

Produkční kmen řasy *Monoraphidium* sp. pro produkci olejů s obsahem polynenasycených mastných kyselin, způsob produkce těchto olejů a použití tohoto produkčního kmene pro průmyslovou výrobu těchto olejů

5

Oblast techniky

Vynález se týká produkčního kmene řasy *Monoraphidium* sp., produkujícího oleje s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin a rovněž způsobu produkce těchto olejů tímto produkčním kmenem.

Dosavadní stav techniky

Esenciální mastné kyseliny, často také nazývané EFA – Essential Fatty Acid, jsou nepostradatelné pro správné fungování organismu. Člověk a většina savců tyto látky musí přijímat v potravě, protože si je sami nedovedou biosyntetizovat. Esenciální mastné kyseliny neslouží jen jako zdroj energie, ale jsou nezbytně nutné pro řadu biologických procesů v organismu, např. jako substrát pro syntézu prostaglandinů a dalších biologicky aktivních látek, jako jsou thromboxany, prostacykliny, atd.

Pro savce včetně člověka jsou primárně esenciální pouze dvě mastné kyseliny, tj. kyselina α -linolenová – polynenasycená mastná kyselina omega-3 (ω -3) a kyselina linolová – polynenasycená mastná kyselina omega-6 (ω -6). Mezi další mastné kyseliny, které jsou jen „podmíněně esenciální“ patří většina polynenasycených mastných kyselin – PUFA, tj. PolyUnsaturated Fatty Acid. Polynenasycené mastné kyseliny obsahují ve své struktuře více než jednu dvojnou vazbu (C=C) v uhlíkovém řetězci.

Podle chemického složení rozlišujeme několik skupin polynenasycených mastných kyselin, z nichž jsou důležité polynenasycené mastné kyseliny ω -3 a polynenasycené mastné kyseliny ω -6. První ze jmenovaných jsou ω -3 mastné kyseliny, což jsou nenasycené mastné kyseliny s dvojnou vazbou na třetím atomu uhlíku od konce uhlovodíkového řetězce. Mezi význačné patří kyselina α -linolenová se zkratkou ALA, tj. $18:3\omega$ -3, která obsahuje osmnáct uhlíkových atomů a tři dvojně vazby, kyselina stearidonová se zkratkou SDA, někdy nazývaná též kyselina moroktová, tj. $18:4\omega$ -3, která obsahuje osmnáct uhlíkových atomů a čtyři dvojně vazby a kyselina hexadecatetraenová, tj. $16:4\omega$ -3, která obsahuje šestnáct uhlíkových atomů a čtyři dvojně vazby. Obecně se polynenasycené mastné kyseliny obsahující čtyři dvojně vazby nazývají kyseliny tetraenové. Polynenasycené mastné kyseliny ze skupiny ω -6 mají poslední dvojnou vazbu v pozici ω -6, což znamená šestou vazbu od methylového konce. Patří mezi ně především kyselina linolová se zkratkou LA, tj. $18:2\omega$ -6, která obsahuje osmnáct uhlíkových atomů a dvě dvojně vazby a kyselina γ -linolenová se zkratkou GLA, tj. $18:3\omega$ -6, která obsahuje osmnáct uhlíkových atomů a tři dvojně vazby.

Kyselina stearidonová je biosyntetizována z kyseliny α -linolenové pomocí enzymu Δ 6-desaturázy. Přírodním zdrojem této kyseliny jsou jen výjimečně rostlinné oleje, např. semena některých druhů konopí, kamejka rolní nebo černý rybíz. Nejbohatším zdrojem jsou však fotosyntetizující mikroorganismy, především řasy, kde obsah této kyseliny dosahuje až desítek procent. Zdrojem kyseliny hexadecatetraenové jsou pouze řasy, ať již mořské nebo i sladkovodní. Jak $18:4\omega$ -3, tak i $16:4\omega$ -3 mastné kyseliny z mořské řasy *Undaria pinnatifida* potlačují produkci eikosanoidů mastocytů myši, zvláště leukotrienu B4 (LTB4), leukotrienu C4 (LTC4) a 5-hydroxyeicosatetraenové kyseliny (5-HETE).

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 kultivovány i v lokalitách nevhodných pro klasické plodiny vyža-

dujících úrodnou půdu. Jednobuněčné řasy již byly ověřeny jako potenciální producenti cenných látek, např. polynenasycených mastných kyselin neboli 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.

5

Významné postavení mezi esenciálními mastnými kyselinami mají kyseliny s 18 atomy uhlíku, tj. kyseliny linolová a α -linolenová, které nelze ve stravě obratlovců ničím nahradit, neboť obratlovci postrádají v důsledku evoluce příslušné enzymy. Polynenasycené mastné kyseliny jsou hlavním činitelem v příznivém vlivu tzv. středomořské diety, jejíž součástí jsou např. mořské ryby, samotné ryby je však netvoří, ale přijímají je přes zooplankton z mořského fytoplanktonu.

10

Mastné kyseliny jsou cenné produkty, obvykle však jednotlivé organismy převážně produkují jen jednu skupinu v závislosti na jejich biosyntetických schopnostech. 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, jako jsou např. střížné síly vznikající při čerpání, oscilacím teploty, intenzitě světla, atd. U venkovních kultivací odpadá zajišťování tepelné a světelné energie, neboť Slunce dodává svoji čistou energii zdarma. V podmínkách mírného pásu je však možné provozovat venkovní kultivace řas jen po omezené období roku, kdy jsou teploty i sluneční záření dostatečně vysoké pro růst těchto mikroorganismů. Proto se neustále hledají a testují nové organismy i různé typy kultivátorů.

15

20

Úkolem vynálezu je najít vhodný organismus, který by byl schopen produkovat oleje s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin při kultivaci v otevřených systémech v našich podnebných podmínkách po celý rok, tedy který by byl schopen růst i za nižších teplot a nižšího záření, který by bylo možno produkovat během chladného období, kdy běžné sinice a řasy prakticky nepřirůstají, který by rostl autotrofně a byl dostatečně rezistentní proti kontaminaci jinými řasami, sinicemi a bakteriemi.

25

30

Podstata vynálezu

Tento úkol řeší kmen řasy *Monoraphidium* sp., který ve smyslu tohoto vynálezu představuje produkční mikroorganismus pro získávání olejů s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin. Produkční kmen řasy *Monoraphidium* sp. je uložen ve sbírce Botanického ústavu AV ČR, Třeboň, Dukelská 135, pod přírůstkovým číslem CCALA 1094: *Monoraphidium* sp. Nedbalová 2009/1. Vynález se dále zabývá průmyslovým použitím tohoto kmene a dále způsobem produkce olejů s obsahem polynenasycených mastných kyselin v průmyslovém kmeni této řasy.

35

40

Tento kmen s výhodou produkuje oleje s tetraenovými kyselinami na bázi kyseliny stearidonové, která představuje více než 20 % hmotn. a kyseliny hexadekatetraenové, která představuje více než 10 % hmotn. z celkového obsahu polynenasycených mastných kyselin. S výhodou je celkový součet podílů kyseliny hexadekatetraenové a kyseliny stearidonové v oleji vyšší než 50 % hmotn.

45

Monoraphidium sp. CCALA 1094 je kmen kokálních zelených řas s buňkami rohlíčkovitého tvaru, s protaženými špičatými konci, lukovitě zpět prohnutými. Rozměry buněk jsou 2 až 3 μ m na šířku a 8 až 16 μ m na délku. Chloroplast je nástěnný, bez pyrenoidu, uprostřed buňky je vykrojený a je zde uloženo jádro. Tyto řasy se rozmnožují nepohlavně, podélným dělením je vytvořeno několik autosport, jak je zobrazeno na obr. 1.

50

Řasy z rodu *Monoraphidium* rostou v mnoha sladkovodních biotopech, jako jsou jezera, rašelinště, drobné vodní tůně, mrtvá ramena řek, ale většinou ne v příliš hojném počtu. Na ostrově Jamese Rosse u pobřeží Antarktidy, východně od nejsevernějšího výběžku Antarktického poloostrova, tvořil druh *Monoraphidium* sp. dominantní složku planktonu v jezerech s trvalou ledo-

55

15 vou pokrývkou. Z jednoho z těchto jezer byl tento druh v roce 2009 izolován roztěrem na agarovou plotnu se Z médiem a výběrem kolonie. Je uložen ve Sběrce autotrofních organismů Botanického ústavu AV ČR, Dukelská 135, Třeboň jako kmen CCALA 1094, Nedbalová 2009/1. Buňky řasy vykazují vhodnou růstovou rychlost v širokém rozmezí teplot od 0 do 30 °C, nejvýhodnější uspořádání představuje kultivační teplota v teplotním rozmezí 10 až 14 °C. Sekvence 18S rDNA tohoto kmene je uvedena na obr. 2. Tento kmen není dosud udržován v žádné jiné řasové sbírce na světě.

10 Kmen *Monoraphidium* sp. CCALA 1094 je novým perspektivním organismem pro produkci olejů. Patří do třídy Chlorophyceae tedy do třídy zelených řas, řádu Sphaeropleales a čeledi Selenastraceae, kde jako zásobní látka slouží olej nebo škrob. Obsah celkových olejů v biomase intenzivně rostoucí kultury *Monoraphidium* sp. CCALA 1094 je i přes 30 % v sušině, polynenasycené mastné kyseliny tvoří více než 60 % celkového množství mastných kyselin. Testování vlivu teploty a intenzity záření na zkřížených gradientech ukázalo, že kmen *Monoraphidium* sp. CCALA 15 1094 roste v širokém rozmezí teplot a vyžaduje nízkou intenzitu slunečního záření, jak znázorňuje diagram na obr. 3. Teplotní optimum je posunuto do oblasti nízkých teplot, proto je tato řasa vhodná pro venkovní pěstování i v chladném období roku. Kultivace probíhala od 26. listopadu do 17. prosince 2015. Růstová křivka kmene, průběh teploty kultivačního média a intenzity FAR neboli fotosynteticky aktivního záření jsou uvedeny na obr. 4.

20 Předmětem vynálezu je také způsob produkce olejů s obsahem polynenasycených mastných kyselin, zejména kyselin tetraenových na bázi kyseliny stearidonové a kyseliny hexadecatetraenové v produkčním kmeni řasy *Monoraphidium* sp. CCALA 1094. Podstata vynálezu spočívá v tom, že produkční kmen řasy se kultivuje v teplotním rozmezí 0 až 30 °C. Ve výhodném provedení se tento kmen kultivuje v teplotním rozmezí 10 až 14 °C.

30 Výhody produkčního kmene řasy *Monoraphidium* sp. podle tohoto vynálezu spočívají zejména ve schopnosti produkce olejů s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin při kultivaci v otevřených systémech v našich podnebných podmínkách po celý rok, tedy ve schopnosti růst i za nižších teplot a nižšího záření. Produkční kmen *Monoraphidium* sp. CCALA 1094 je schopen produkovat polynenasycené mastné kyseliny během chladného období, kdy běžné sinice a řasy prakticky nepřirůstají, roste autotrofně a je dostatečně rezistentní proti kontaminaci jinými řasami, sinicemi a bakteriemi.

35 Objasnění výkresů

Uvedený vynález bude blíže objasněn na následujících vyobrazeních, kde:

- 40 obr. 1 zobrazuje buňky kmene *Monoraphidium* sp. CCALA 1094 pod světelným mikroskopem,
obrá. 2 zobrazuje sekvenci 18S rDNA kmene *Monoraphidium* sp. CCALA 1094,
obrá. 3 zobrazuje diagram použití zkříženého gradientu teploty a záření pro stanovení optimálních podmínek růstu kmene CCALA 1094, testováno v mikrodestičkách,
45 obr. 4 znázorňuje průběh růstové křivky, teploty kultivačního média a intenzity FAR při venkovní kultivaci,
50 obr. 5 znázorňuje tabulku složení zásobních roztoků pro přípravu média Z8, Fe-EDTA roztoku a Gaffronova roztoku mikroelementů,
obrá. 6 zobrazuje obsah mastných kyselin a lipidů při poloprovozní kultivaci *Monoraphidium* sp. CCALA 1094,

55

obr. 7 znázorňuje graf produkce mastných kyselin 18:4 ω -3 a 16:4 ω -3 kmenem *Monoraphidium* sp. CCALA 1094 a jinými významnými producenty.

5 Příklad uskutečnění vynálezu

Příprava inokula

Kmen *Monoraphidium* sp. CCALA 1094 je uchováván ve Sbírce autotrofních organismů Botanického ústavu AV ČR v Třeboni jako rostoucí kultura ve zkumavce na šikmém agaru při cca 15 °C, pod zářivkovým osvětlením 10 W.m⁻². *Monoraphidium* sp. CCALA 1094 má rozměry buněk 2 až 3 μ m na šířku a 8 až 16 μ m na délku, jak je znázorněno na obr. 1. Na obr. 1 je také zobrazeno dělení mateřské buňky na autospory. Z této kultury je kmen předpěstován vsádkovou, stacionární kultivací na kapalném médiu Z8, jehož složení je znázorněno v tabulce na obr. 5, ve skleněných lahvích, s obsahem 2 L. Do 700 mL destilované vody je přidáno po 10 mL jednotlivých mikroelementů z obr. 5 ze zásobních roztoků, 0,2 mL Fe-EDTA roztoku a 0,08 mL Gaffronova roztoku mikroelementů, jejichž složení je taktéž zobrazeno na obr. 5. Celá směs je následně doplněna destilovanou vodou na 1 L. Pro velkoobjemovou kultivaci na plošině je možné odvážené chemikálie sypat přímo na plošinu a nechat jednotlivě rozpustit ve vodě s průtokem CO₂. Dvoulitrové lahve nejprve obsahují 0,25 L média a postupně po zhoustnutí je objem doplňován na celkové 2 L. Míchání suspenze a syčení CO₂ je zajištěno probubláváním nadbytkem vzduchu se 2 % obj. CO₂ pomocí trubičky zavedené na dno lahve. Směs je následně filtrována přes membránový filtr Milipore. Lahve jsou umístěny ve vodní lázni, kde je teplota udržována na 10 °C kompresorovým chladicím okruhem. Skleněnou stěnou je lázeň z boků nepřetržitě osvětlována LED panely s intenzitou FAR, tedy fotosynteticky aktivní radiace tj. 400 až 720 nm s energií 40 W.m⁻². Na začátku kultivace a po každém zvýšení objemu je intenzita světla na prvních 5 dní snížena na 20 W. m⁻², dokud kultura viditelně nezhoustne. Na obr. 3 je znázorněn růst řasy *Monoraphidium* sp. CCALA 1094 na zkřížených gradientech teploty a osvětlení pro zjištění optimálních hodnot pro kmen *Monoraphidium* sp. CCALA 1094, které bylo testováno v mikrostřediscích.

Poloprovozní kultivace

Poloprovozně je kmen *Monoraphidium* sp. CCALA 1094 pěstován na plošině firmy BCS Engineering Brno, umístěné ve skleníku Botanického ústavu v Třeboni, tedy v klimatických podmínkách střední Evropy. Jedná se o plošinový kultivátor se skloněnou šikmou plochu o délce 12 m a šířce 1 m, spád 15 cm, objem 140 L. Tento typ je určen pro velmi husté suspenze v tenké vrstvě do 10 mm. Rozpěstování ze sbírkové kultury je provedeno analogicky, jako je popsáno v příkladu 1.

Narostlé inokulum je převedeno celé do 150 L média Z8. Počáteční koncentrace řasy je v kultivační plošině po naočkování 0,5 g.L⁻¹. Do média je dávkován CO₂ zavedením do odstředivého čerpadla pro rychlé vstřebání suspenzí řas a jeho koncentrace je regulována na 5 L.hod⁻¹. Po celou dobu kultivace je teplota suspenze a intenzita FAR zaznamenávána v desetiminutových intervalech pomocí dataloggerů Minikin (EMS, Brno). Teplota suspenze kolísá v rozmezí 3,2 až 21,9 °C, průměrná teplota za celé období je 10,0 °C. Hodnoty FAR se pohybují v rozmezí 0 až 180 W.m⁻², průměrná intenzita FAR je pouze 8 W.m⁻². Narostlá biomasa byla po 21 dnech, tedy po období 26. 11. až 17. 12. 2015 sklizena odstředěním v odstředivce EVODOS 10 při 7000 otáček/min, zmrazena na -20 °C a později lyofilizována neboli vakuově odmrazena při tlaku 0,05 hPa. Hustota suspenze na konci kultivace byla 13,56 g.L⁻¹, sklizeno bylo celkem 2035 g sušiny, tj. 169,6 g.m⁻². Při obsahu polynenasycených mastných kyselin 18:4 ω -3 a 16:4 ω -3 44 až 54 % z celkového množství mastných kyselin je jejich produkce 20 g.m⁻² za třítydenní cyklus. Obr. 4 zobrazuje průběh růstové křivky, teploty kultivačního média a intenzity fotosynteticky aktivního záření FAR při této venkovní kultivaci. Obsah polynenasycených mastných kyselin a lipidů stanovených v sušině kmenu *Monoraphidium* sp. CCALA 1094 v 7., 14. a 21. dni kultiva-

vace je zobrazeno na obr. 6. Na obr. 7 jsou porovnání významní producenti 18:4 ω -3 a 16:4 ω -3 kyselin s kmenem řasy *Monoraphidium* sp. CCALA 1094. Přitom vyšších hodnot je dosaženo jen u laboratorních, uzavřených systémů kultivace, kdežto řešení podle tohoto vynálezu je ve skleníku, ale typu otevřeného plošinového kultivátoru. Mikroskopický rozbor prokázal, že řasa dobře snáší mechanické namáhání odstředivým čerpadlem, počet mechanicky rozbitých buněk je pod 1 %. Další výhodou je, že řasa roste v běžných typech kultivátorů, které se již běžně používají pro komerční produkci biomasy sinic jako např. *Spirulina* či *Chlorella*.

Sušina biomasy

Sušina biomasy je stanovena centrifugací vzorku 20 min při 3000 g, v plastových, předvážených zkumavkách Eppendorf o objemu 2 mL. Sediment je vysušen při 105 °C do konstantní váhy a zvážen. Množství lipidů bylo stanoveno vážením po odpaření směsi hexan/diethyl ether.

Identifikace mastných kyselin

100 mg lyofilizované biomasy je zmýdelněno 10 % roztokem KOH v metanolu při pokojové teplotě přes noc. Neutrální a bazické sloučeniny jsou z roztoku o pH 9 vytřepány diethyletherem a vodný roztok s mastnými kyselinami je okyselen na pH 2 a kyseliny jsou následně extrahovány do hexanu. Mastné kyseliny jsou methylovány směsí BF₃-methanol a identifikovány pomocí GC-MS, tedy plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií, s detektorem iontová past s ionizací nárazu elektronů. Vzorek je nastríknut do kapilární kolony s polární stacionární fází, 25 m × 0,25 mm × 0,1 μ m a pro eluci je použit teplotní gradient 5 min při 50 °C, se zahříváním kolony rychlostí 10 °C min⁻¹ do 240 °C a izotermicky 15 min při 240 °C. Nosným plynem je helium s průtokem 0,52 mL.min⁻¹. Všechna spektra jsou skenována v rozsahu 50 až 600 Da. Struktura methyl esterů je určena na základě retenčních časů, jejich fragmentace a srovnáním spekter se spektry čistých látek.

Průmyslová využitelnost

Produkční kmen řasy *Monoraphidium* sp. podle tohoto vynálezu lze využít pro produkci olejů s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin při nízkých kultivačních teplotách jako přísadavek diety člověka i zvířat, krmiva pro ryby a zooplankton v akvakulturách či v kosmetice.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Produkční kmen řasy *Monoraphidium* sp. pro produkci olejů s obsahem polynenasycených mastných kyselin uložený ve Sbírce autotrofních organismů Botanického ústavu AV ČR, Třeboň, Dukelská 135, pod přírůstkovým číslem CCALA 1094: *Monoraphidium* sp. Nedbalová 2009/1.

2. Produkční kmen řasy podle nároku 1, kde produkované oleje obsahují více než 17 % hmotn. kyseliny hexadecatetraenové a více než 27 % hmotn. kyseliny stearidonové.

3. Produkční kmen řasy podle nároku 2, kde celkový součet podílů kyseliny hexadecatetraenové a kyseliny stearidonové v oleji je vyšší než 50 % hmotn.

4. Použití produkčního kmene řasy *Monoraphidium* sp. podle některého z nároků 1 až 3 pro produkci olejů s obsahem polynenasycených mastných kyselin, zejména kyselin tetraenových na bázi kyseliny stearidonové a kyseliny hexadecatetraenové.

5. Způsob produkce olejů s obsahem polynenasycených mastných kyselin, zejména kyselin tetraenových na bázi kyseliny stearidonové a kyseliny hexadecatetraenové v produkčním kmeni řasy podle některého z nároků 1 až 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že produkční kmen řasy se kultivuje v teplotním rozmezí 0 až 30 °C.

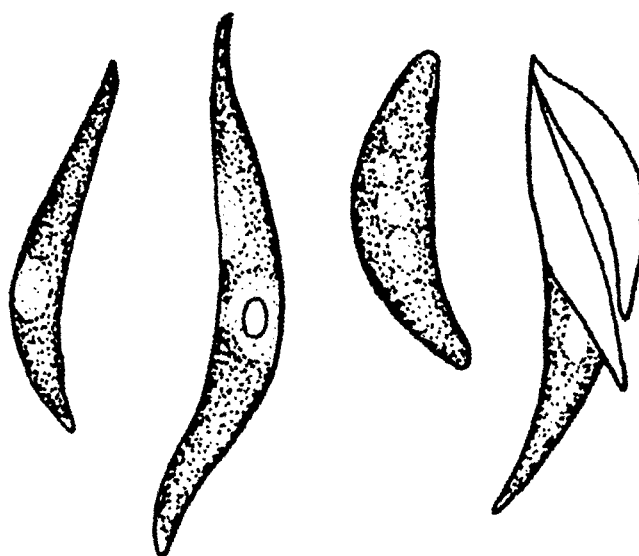
5

6. Způsob podle nároku 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že produkční kmen řasy se kultivuje v teplotním rozmezí 10 až 14 °C.

10

7 výkresů

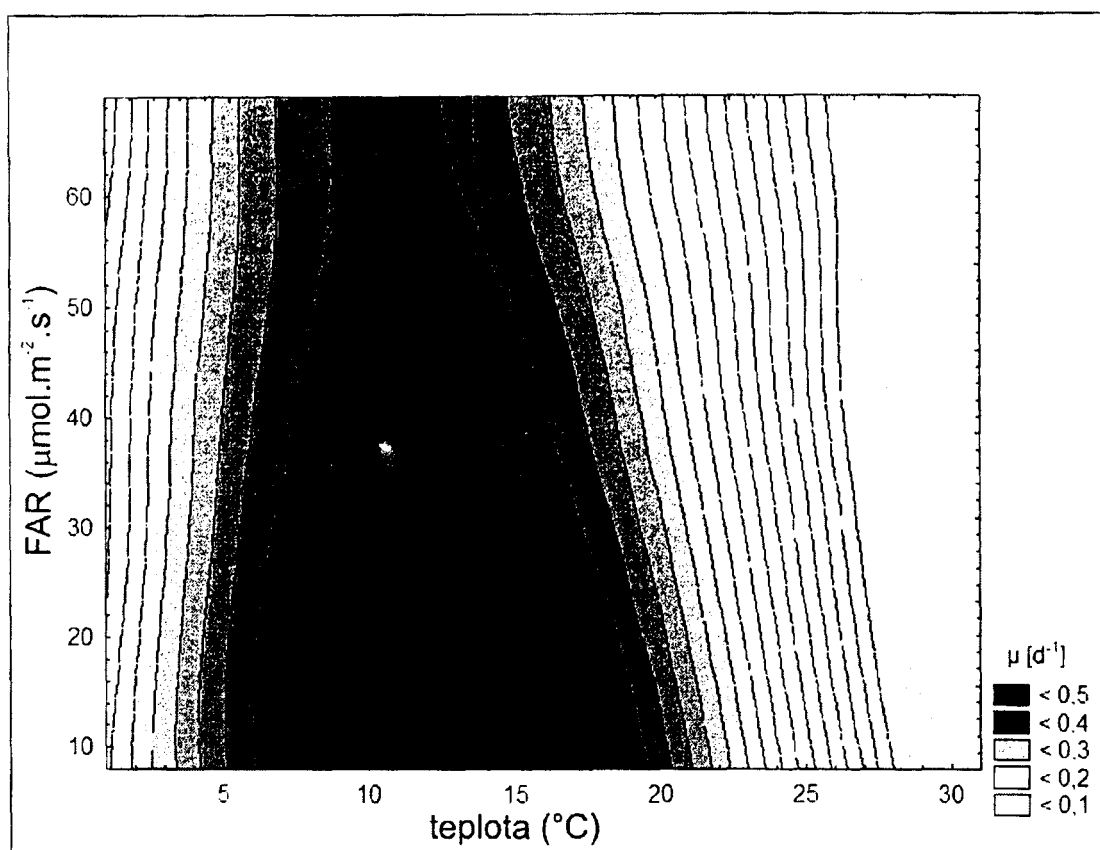
CZ 306738 B6



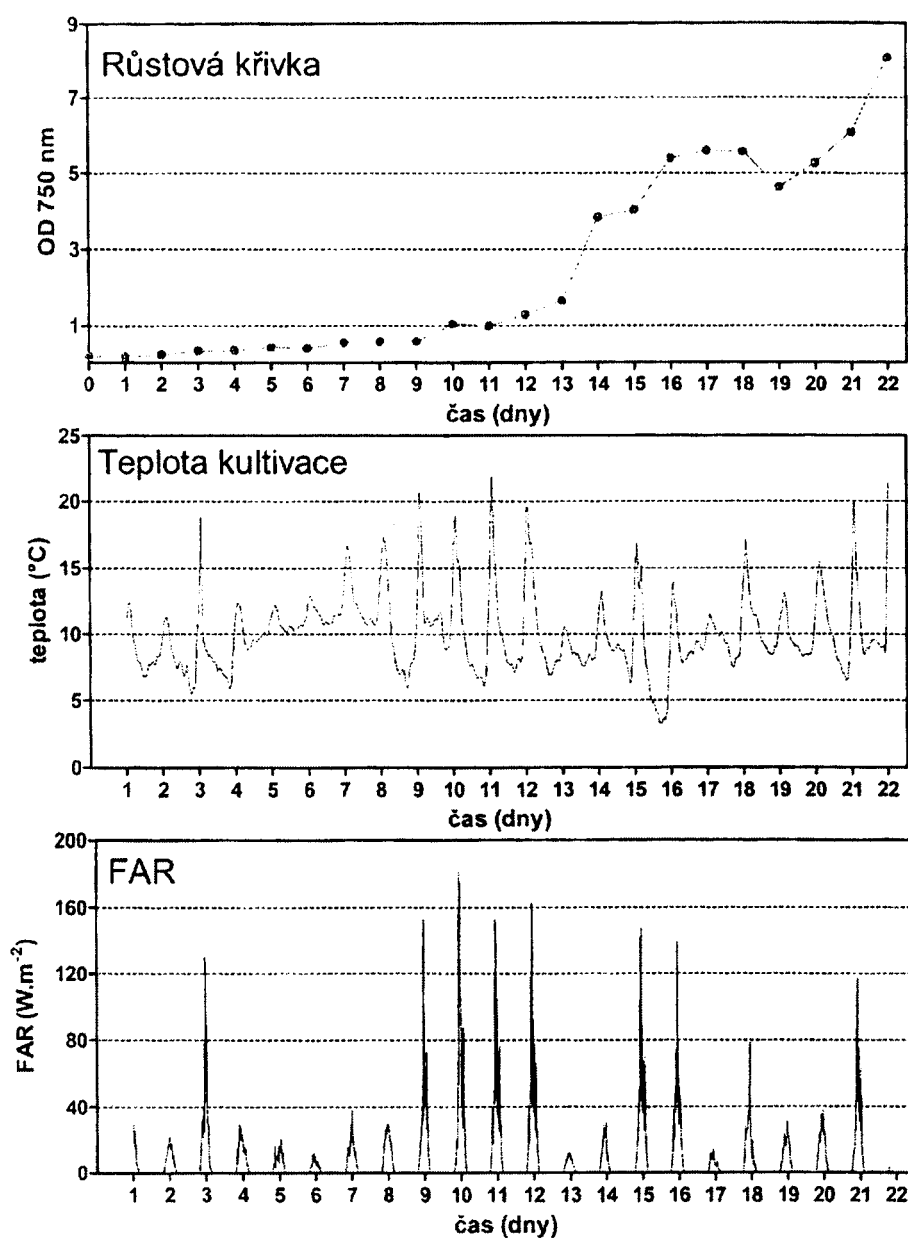
OBR. 1

CTGCTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGTTTATTTGAT
GGTACTTTTACACGGATAACCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCC
CGACTTCAGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGACTCTGTCCGA
CCCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATAGCCTCGTGCTGGCGATGTT
TCATTCAAAITTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT
GGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAC
GGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGATACG
GGGAGGTAGTGACAATAAAATAACAATACCGGGCATTCAATGTCTGGTAATTGGA
ATGAGTACAACTCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATAITTAAGTTGTTGCAGTTAAA
AAGCTCGTAGTTGGATTTTCGGGTGGGTTCAGCGGTCCGCCTATGGTGAGTACTG
CTGTGGCCCTCCTTTCTGTGCGGGGACGGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCG
GATTCGACGATGATACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAAGCCTACGCTCT
GAATACTTTAGCATGGAATATCGCGATAGGACTCTGGCCTATCTCGTTGGTCTGT
AGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTTCGTATTTCAATTGTCA
GAGGTGAAATTCTTGGAATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAG
GATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCG
TCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGAGGATGTTCTTTTGAT
GACTTCTCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCGGGGGGGAGTATG
GTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCCAGGCGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAGACATAATG
AGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTATGGGTGGTGGTGCATGGCCG
TTCTTAGTTGGTGGGTTCCTTGTGAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCA
GCCTGCTAAATAGTCACTTTTCGCTTTTTGCGGATGGCCGACTTCTTAGAGGGACA
GATGCTACAAAAGCATCGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTA
GATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACACGTTCAACAAGCCTATCCTTGA
CCGAGAGGTCTGGGTAATCTTTGAAACCGTGTGCGTGATGGGGATAGATTATTGCA
ATTATTAGTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAGGCGCAAGTCATCAGCTTGCGCCG
ATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCT
GGTGAAGTGTTTCGGATTGGCGAAGCGGGTGGCAACACTTGCTTTTGCCGAGAAGT
TCATATACTGAGTACGTCCTTATGACTACTTCA

OBR. 2



OBR. 3



OBR. 4

Medium Z8

sloučenina	Zásobní roztok (g.l ⁻¹ dH ₂ O)	Použité množství do 1 litru
NaNO ₃	46,7	10 ml
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5,9	10 ml
K ₂ HPO ₄	3,1	10 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5	10 ml
Na ₂ CO ₃	2,1	10 ml
Fe-EDTA roztok	Viz následující předpis	0,2 ml
Gaffronův roztok mikroelementů	Viz následující předpis	0,08 ml

Fe-EDTA roztok

sloučenina	Použité množství
HCl (35%)	2,2 ml
dH ₂ O	250 ml
FeCl ₃ .6H ₂ O	4,5 g
Na ₂ EDTA	4,65 g

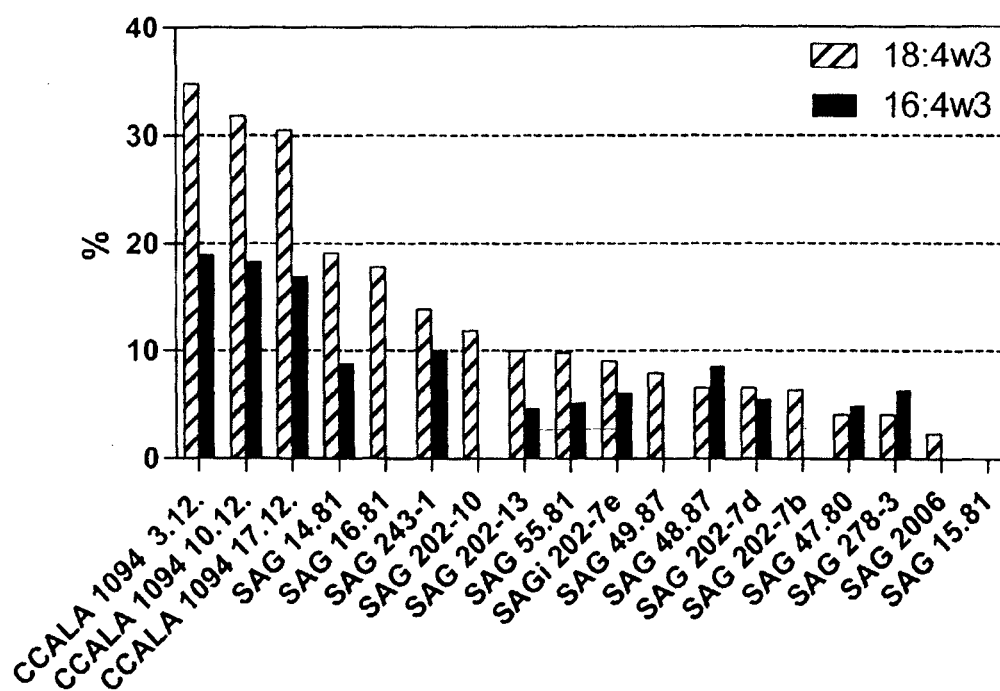
Gaffronův roztok mikroelementů

sloučenina	Použité množství do 100 ml
H ₃ BO ₃	0,31 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,223 g
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	0,003 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,0088 g
KBr	0,0119 g
KI	0,0083 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0287 g
Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,0154 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,0146 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0125 g
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O	0,0198 g
Cr(NO ₃) ₂ .7H ₂ O	0,0037 g
V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ .16H ₂ O	0,0035 g
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ .24 H ₂ O	0,0474 g

OBR. 5

Mastná kyselina	Triviální název	7. den (%)	14. den (%)	21. den (%)
13:0		0,8	0,9	0,5
14:0	myristová	0,2	0,1	0,2
16:0	palmitová	17,0	17,4	17,5
16:1 ω 7	palmitolejová	3,5	2,5	1,9
16:1 ω 3		0,2	0,1	0,2
16:3 ω 3		1,7	1,7	1,8
16:4 ω 4	hexadekatetraenová	19,1	18,4	17,0
18:0	stearová	4,3	3,2	1,7
18:1 ω 9	olejová	10,1	12,5	17,0
18:1 ω 7	cis-vaccenic	0,2	0,0	0,2
18:2 ω 6	linolová	2,3	4,0	5,7
18:3 ω 6	γ -linolenová	0,1	0,2	0,4
18:3 ω 3	α -linolenová	4,9	6,4	7,9
18:4 ω 3	stearidonová	34,7	31,8	27,5
22:0	behenová	0,9	0,8	0,5
Lipidy v sušině (%)		33,6	24,5	27,0

OBR. 6



OBR. 7

Konec dokumentu
