

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

35 669

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
A01H 13/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)
A23D 9/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-39368**
(22) Přihlášeno: **22.04.2021**
(30) Právo přednosti:
22.04.2021 CZ PV 2021-202
(47) Zapsáno: **21.12.2021**

- (73) Majitel:
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, Krč,
CZ
Botanický ústav AV ČR, v.v.i., Průhonice, CZ
- (72) Původce:
RNDr. Tomáš Řezanka, CSc., DSc., Praha 4,
Chodov, CZ
doc. RNDr. Linda Nedbalová, Ph.D., Třeboň,
Třeboň II, CZ
RNDr. Jaromír Lukavský, CSc., Třeboň, Třeboň I,
CZ
- (74) Zástupce:
PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Okružní
2824, 370 01 České Budějovice, České Budějovice
3

- (54) Název užitého vzoru:
Směs olejů z řasy Chodatodesmus australis

Směs olejů z řasy *Chodatodesmus australis*

Oblast techniky

Technické řešení se týká oblasti mikrobiologie, konkrétně směsi olejů z řasy *Chodatodesmus australis*, produkujícího oleje s vysokým obsahem polynenasycených esenciálních mastných kyselin.

Dosavadní stav techniky

Esenciální mastné kyseliny, často také nazývané EFA – Essential Fatty Acid, jsou nepostradatelné pro správné fungování organismu, ale člověk a většina savců si tyto kyseliny nedovede biosyntetizovat. Ve své podstatě, primárně jsou 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). Podmíněně esenciální je ale většina polynenasycených mastných kyselin neboli PUFA, tj. Poly Unsaturated Fatty Acid, které obsahují ve svém uhlíkovém řetězci více než jednu dvojnou vazbu. Organismus savců a pochopitelně i člověka biosyntetizuje PUFA, ale přeměna těchto dvou kyselin, linolové a α -linolenové, v další PUFA je však nízká a dosahuje hodnot asi 10 % u mužů a asi 20 % u žen, u nichž je příznivě ovlivněna estrogeny. Esenciální mastné kyseliny neslouží jen jako zdroj energie, ale jsou nezbytně nutné pro řadu biologických procesů v organismu, např. jako substrát pro biosyntézu prostaglandinů a dalších biologicky aktivních látek, jako jsou thromboxany a prostacykliny.

Podle chemického složení, resp. struktury rozlišujeme několik skupin PUFA. Mastné kyseliny ω -3 obsahují dvojnou vazbu na třetím atomu uhlíku od konce uhlovodíkového řetězce. Lze mezi ně řadit kyselinu α -linolenovou, tj. 18:3 ω -3, která obsahuje osmnáct uhlíkových atomů a tři dvojně vazby, kyselinu stearidonovou, někdy nazývanou též kyselinou moroktovou, tj. 18:4 ω -3, která obsahuje osmnáct uhlíkových atomů a čtyři dvojně vazby, kyselinu hexadekatetraenovou, tj. 16:4 ω -3, která obsahuje šestnáct uhlíkových atomů a čtyři dvojně vazby a kyselinu hexadekatrienovou, tj. 16:3 ω -3, která obsahuje šestnáct uhlíkových atomů a tři dvojně vazby. Polynenasycené mastné kyseliny ω -6 mají poslední dvojnou vazbu v pozici ω -6, což je šestý uhlík od methylového konce. Patří mezi ně především kyselina linolová, tj. 18:2 ω -6, která obsahuje osmnáct uhlíkových atomů a dvě dvojně vazby.

Kyselina stearidonová je biosyntetizována z kyseliny α -linolenové pomocí enzymu delta 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. Zdrojem kyselin hexadekatetraenové a hexadekatrienové jsou pouze řasy, ať již mořské nebo také sladkovodní. Z ω -3 PUFA se tvoří prostaglandiny a leukotrieny, které mají protizánětlivé, bronchodilatační, protisrážlivé účinky.

Obsah PUFA je však pouze jednou z podmínek úspěšnosti biotechnologické produkce těchto sloučenin. Organismus, v tomto případě řasa vhodná pro venkovní kultivace musí dále snadno růst v daném zařízení, musí mít určitou odolnost proti technologickému zacházení, jako jsou např. střížné síly nebo mechanické vlivy vznikající při čerpání, musí snášet oscilace teploty a intenzity světla atd. U venkovních kultivací odpadá nákladné zajišťování tepelné a světelné energie, neboť Slunce dodává energii přirozeným způsobem. 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 s výhodnými vlastnostmi, které by umožnily využívat stávající kultivační zařízení i v chladném období roku.

Se změnou způsobu stravování v posledních stoletích docházelo i ke změně typu konzumovaných mastných kyselin. Rychlý vývoj společnosti, především západní civilizace, po druhé světové válce vedl i ke změně konzumovaných poměrů ω -6 a ω -3 PUFA, a to především díky velké spotřebě rostlinných olejů. Nadužívání rostlinných olejů posunulo poměr z ideálního poměru ω -6/ ω -3 1:1 až 1:0,25 dle doporučení Světové zdravotnické organizace (WHO) na 1:0,1 až 1:0,03, což jsou hodnoty typické pro obyvatele Evropy ale i dalších zemí. Tato změna poměru nese s sebou celou řadu komplikací, spočívající především ve zvýšeném výskytu kardiovaskulárních onemocnění, zvyšuje se riziko rakoviny a autoimunitních nemocí, duševních poruch, zhoršení paměti v podobě Alzheimerovy choroby, dochází k retardaci vývoje, poruchám zraku, svalové slabosti a třesu, dyslipidémii, inzulínové rezistenci, vysokému krevnímu tlaku, trombóze, cukrovce, astmatu, nadváze a jiných, jak je popsáno v publikaci Simopoulos 2009 (DOI: 10.1159/000235706).

Rod *Chodatodesmus* byl popsán v práci Hegevald E. et al. 2013 (DOI: 10.5507/fot.2013.013), která obsahuje sekvence druhu *Chodatodesmus mucronulatus*, kmen SAG 2332 s neznámým místem sběru. Další sekvence tohoto rodu dostupné v databázi GenBank zahrnují několik kmenů *Chodatodesmus australis* podle publikace Sciuto K. et al., 2015 (DOI: 10.1111/jpy.12355). Dosud známý výskyt řasy druhu *Chodatodesmus australis* je omezen pouze na Antarktidu. U žádného z kmenů rodu *Chodatodesmus* nebyly dosud analyzovány mastné kyseliny.

Jako potvrzení výše uvedených faktů, uvádíme příklady poměrů ω -6 a ω -3 PUFA v některých biotechnologicky kultivovaných řasách vycházející z publikace Lang et al. 2011 (DOI: 10.1186/1471-2229-11-124). U běžně velkoobjemově kultivovaných řas, jako je např. *Chlorella*, je poměr ω -6/ ω -3 1:0,40, *Parachlorella kessleri* (*Chlorella kessleri*) 1:0,19, *Scenedesmus* 1:0,45. U sinic se pohybuje poměr těchto mastných kyselin od 1:0,30 - *Spirulina* (*Arthrospira*), až po případy, kdy sinice neprodukuje žádné ω -3 PUFA. Mají tedy tento poměr téměř podobný běžným rostlinným olejům, např. řepkovému 1:0,5, sójovému 1:0,14, olivovému 1:0,07 nebo slunečnicovému oleji, který neobsahuje ω -3 PUFA.

Úkolem tohoto technického řešení je najít vhodný organismus, který by byl schopen produkovat oleje s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin při kultivaci v otevřených systémech v podnebných podmínkách mírného pásu, např. ČR, po celý rok, který by byl s výhodou schopen růst i za nižších teplot a nižšího záření, a který by byl schopen produkovat oleje s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin i během chladného období, kdy běžně kultivované sinice a řasy prakticky nepřirůstají, a který by rostl autotrofně a byl dostatečně rezistentní proti kontaminaci jinými řasami, sinicemi a bakteriemi.

Podstata technického řešení

Tento úkol řeší směs olejů produkovanou kmenem řasy *Chodatodesmus australis*, který ve smyslu tohoto technického řešení představuje produkční mikroorganismus pro získávání olejů s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Produkční kmen řasy *Chodatodesmus australis* je uložen ve sbírce Botanického ústavu AV ČR, Třeboň, Dukelská 135, pod přírůstkovým číslem CCALA 1131: *Chodatodesmus australis* kmen Nedbalová 2009/2.

Tento kmen s výhodou produkuje oleje, ve kterých z celkového obsahu mastných kyselin představují nenasycené mastné kyseliny až 69 % hmotn. Ty jsou považovány za esenciální, tj. nezbytné, nebo alespoň příznivé pro zdraví obratlovců včetně člověka. Ve výhodném provedení kmen produkuje olej s obsahem 20,3 % hmotn. kyseliny linolové, 19,7 % hmotn. kyseliny α -linolenové, 15,6 % hmotn. kyseliny olejové, 4,5 % hmotn. kyseliny stearidonové a 24,3 % hmotn. sumy kyselin hexadekatrienové a hexadekatetraenové. Kyselina linolová a kyselina α -linolenová představují polynenasycené esenciální mastné kyseliny. Kmen *Chodatodesmus australis* CCALA 1131 obsahuje dané PUFA ω -6/ ω -3 v poměru až 1:3,24, čili i značně lepším než poměr 1:1, který doporučuje WHO, je tedy výhodný jako nutriční přípravek pro lidi i zvířata.

Buňky kmene *Chodatodesmus australis* CCALA 1131 jsou znázorněny na obr. 1, jak se jeví ve světelném mikroskopu. *Chodatodesmus australis*, CCALA 1131 patří do kokálních zelených řas s buňkami kulovitého až oválného tvaru, rozměry buněk jsou 5 až 20 µm, obsahují několik nástěnných chloroplastů s jedním pyrenoidem. Rozmnožují se nepohlavně, dělením do několik autospor, nejčastěji do 2-4 jak je zobrazeno na obr. 1-c. Staré buňky mají v centru oranžovou kapku oleje zbarveného karotenoidy.

Kmen CCALA 1131 byl identifikován jako *Chodatodesmus australis* na základě analýzy jaderného molekulárního markeru ITS2 rDNA., který tvoří nekódující oblast mezi dvěma kódujícími úseky 5.8S a 26S rDNA a je běžně u zelených řas využívána pro rozlišení blízce příbuzných druhů. Částečná sekvence ITS2 rDNA markeru u kmene CCALA 1131 je: GTTTACACCCTCACCCCTCCACCTTGTGTGGGTCGGTTGGCTTTCTAGCTAACCTTG GGGTGGATCTGGCTTCCCCAATGCGCTTTTGCGGGTTGGGTGGCTGAAGTGTAGAG GCTTAAACAAGGACCCGATATGGGCGCAACTGGATAGGTAGCACCGGCTTCTGCCG ACTACACGAAGTTGTAGCTTGTGGACTTTGTTAGGGGCCAAGCAGGAAACG. Tato sekvence u kmene CCALA 1131 vykazuje 99 % shodu se sekvencemi jiných kmenů tohoto druhu dostupnými v databázi GenBank, HG514415.1, HG514414.1 a AM419228.1.

Kmen *Chodatodesmus australis* CCALA 1131 byl izolován na ostrově Jamese Rosse u pobřeží Antarktidy, východně od nejsevernějšího výběžku Antarktického poloostrova, kde druh *Chodatodesmus australis* byl přítomen v litorálu jezera Black Lake. Z tohoto jezera byl tento druh v roce 2009 izolován roztěrem na agarovou plotnu se SŠ 1/2 médiem o složení dle tabulky 1 a výběrem kolonie. Patří do třídy Chlorophyceae, tedy do třídy zelených řas, řád Sphaeropleales, čeleď Scenedesmaceae, kde jako zásobní látka slouží olej a škrob. Obsah celkových olejů v biomase intenzivně rostoucí kultury *Chodatodesmus australis* CCALA 1131 je více než 13 % v sušině, polynenasycené mastné kyseliny tvoří více než 50 % celkového množství mastných kyselin. Buňky řasy vykazují vhodnou růstovou rychlost v širokém rozmezí teplot, nejvýhodnější uspořádání představuje kultivační teplota v teplotním rozmezí 14 až 16 °C. *Chodatodesmus australis* CCALA 1131 roste v širokém rozmezí teplot a vyžaduje nízkou intenzitu slunečního záření, jak znázorňuje diagram na obr. 2. Teplotní optimum je posunuto do oblasti nízkých teplot, proto je tato řasa vhodná pro venkovní pěstování i v chladném období roku. Růstová křivka kmene, průběh teploty kultivačního média a intenzity FAR neboli fotosynteticky aktivního záření jsou uvedeny na obr. 3, 4 a v tabulce 2.

Výhody směsi olejů z řasy *Chodatodesmus australis* CCALA 1131 podle tohoto technického řešení spočívají zejména v produkci olejů s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin při kultivaci řasy *Chodatodesmus australis* v otevřených systémech v našich podnebných podmínkách po celý rok, tedy ve schopnosti růst i za nižších teplot a nižšího záření. Produkční kmen *Chodatodesmus australis* CCALA 1131 je schopen produkovat polynenasycené mastné kyseliny během chladného období, roste autotrofně a je dostatečně rezistentní proti kontaminaci jinými řasami, sinicemi a bakteriemi. Jeho využití může prodloužit kultivační sezónu příslušnému průmyslovému zařízení. Zároveň je tento kmen odolný i vůči vyšším teplotám, a proto nehrozí nebezpečí odumření při oscilaci teploty během zimního slunečného dne.

Objasnění výkresů

Uvedené technické řešení bude blíže objasněno na následujících vyobrazeních, kde:

obr.1 zobrazuje buňky kmene *Chodatodesmus australis* CCALA 1131 pod světelným mikroskopem, a – mladé kulovité buňky, b – oválné dospělé buňky, c – mateřská buňka se 4 autosporami, d – dospělé buňky ve stacionární fázi růstové křivky, d-vlevo buňka s velkou oranžovou kapkou oleje s karotenoidy,

obr. 2 zobrazuje použití zkřížených gradientů teploty a záření pro stanovení optimálních podmínek růstu kmene CCALA 1131, testováno v Petriho miskách v objemu 20 mL, izočáry zobrazují hodnoty sušiny (0,1 až 2,1 g.L⁻¹), v dolní části obrázku jsou vyneseny generalizované aditivní modely závislosti koncového množství sušiny na ozáření a teplotě,

5

obr. 3 zobrazuje průběhy teploty vzduchu a suspenze při venkovní kultivaci od 7. 1. 2021 do 24. 2. 2021,

10

obr. 4 zobrazuje průběh intenzity ozáření FAR (fotosynteticky aktivním zářením) a denní sumy záření při venkovní kultivaci od 7. 1. 2021 do 24. 2. 2021,

obr. 5 zobrazuje poloprovozní kultivaci *Chodatodesmus australis*, růst je měřen jako OD 750 nm. 1 cm⁻¹ a v případě exponenciální a lineární fázi je růstová křivka měřená jako sušina (DW).

15

Příklad uskutečnění technického řešení

Příprava inokula

- 20 Kmen *Chodatodesmus australis* CCALA 1131 je uchováván ve Sbírce autotrofních organismů Botanického ústavu AV ČR v Třeboni jako rostoucí kultura ve zkumavce na šikmém agaru s médiem SŠ 1/2, při cca 15 °C, pod zářivkovým osvětlením 46 μmol.m⁻².sec⁻¹. Z této kultury je kmen předpěstován vsádkovou, stacionární kultivací na stejném médiu, jehož složení je znázorněno v tabulce 1, ve skleněných lahvích, o objemu 2 L. Do 700 mL destilované vody je
- 25 přidáno po 10 mL jednotlivých mikroelementů.

Tabulka 1: Složení média SŠ 1/2.

Komponenta	Zásobní roztoky (do 1 L dest. H ₂ O)	Ze zásobního roztoku (do 500 mL)
Zásobní roztok 1.		
MgSO ₄ .7H ₂ O	98,8 g	10 mL
Stopové prvky (viz. předpis níže)		1 mL
Zásobní roztok 2.		
KNO ₃	202,0 g	10 mL
CaCl ₂ .6H ₂ O	1,1 g	
Fe-EDTA	1,8 g	
Zásobní roztok 3.		
KH ₂ PO ₄	34,0 g	10 mL

Zásobní roztok stopových prvků.	do 1 L dest. H ₂ O)
Komponenta	
MnSO ₄ .4H ₂ O	1,18 g
H ₃ BO ₃	3,086 g
CoSO ₄ .7H ₂ O	1,404 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,244 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,43 g
(MN ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1,84 g

30

Celá směs je následně doplněna destilovanou vodou na objem 1000 mL. Dvoulitrové lahve nejprve obsahují 250 mL média a postupně po zhoustnutí suspenze je objem doplňován na celkový objem 2000 mL. Míchání suspenze a syčení CO₂ je zajištěno probubláváním nadbytkem vzduchu se 2 % obj. CO₂ pomocí trubičky zavedené na dno lahve, aerační směs je filtrována přes membránový bakteriální filtr Milipore (Midisart 2000, PT FE IN) s póry 0,2 µm. Lahve jsou umístěny ve vodní lázni, kde je teplota udržována pod 10 °C kompresorovým chladícím okruhem. Skleněnou stěnou je lázeň z boků nepřetržitě osvětlována LED panely s intenzitou FAR (fotosynteticky aktivního záření) s energií 180 µmol.m⁻².s⁻¹, což představuje cca pětinu sluneční intenzity. Na začátku kultivace a po každém zvýšení objemu je intenzita světla na prvních 5 dní snížena na 90 µmol.m⁻².s⁻¹, dokud kultura viditelně nezhoustne. Na obr. 2 je znázorněn růst řasy *Chodatodesmus australis* CCALA 1131 na zkřížených gradientech teploty a osvětlení pro zjištění optimálních hodnot pro kmen *Chodatodesmus australis* CCALA 1131, které je testováno v Petriho miskách s kapalným médiem s objemy po 20 mL.

15 Poloprovozní kultivace

Poloprovozně byl kmen *Chodatodesmus australis* CCALA 1131, kmen 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 150 L. Tento typ je určen pro velmi husté suspenze v tenké vrstvě do 10 mm.

Narostlé inokulum je převedeno celé do 150 L média SŠ 1/2, které je připraveno z vodovodní vody vsypáním jednotlivých komponent dle předpisu. 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 vsřebání suspenzí řas a jeho koncentrace je regulována na 5 L.h⁻¹. Po celou dobu kultivace je teplota suspenze a intenzita FAR zaznamenávána v pravidelných intervalech po 10 min. datalogery Minikin Tie a Minikin QT i (EMS Brno, CZ).

Řasa byla v poloprovozním měřítku pěstována 7. 1. až 24. 2. 2021. Obr. 3, 4 a následující tabulka 2 zobrazují teploty kultivačního média a intenzity FAR při venkovní kultivaci. Teplota suspenze kolísala v rozmezí 5,0 až 23,8 °C, aritmetický průměr byl 9,4 °C. Hodnoty FAR oscilovaly v rozmezí 0 (v noci) až 439 µmol.m⁻².s⁻¹, celodenní průměr byl 39 µmol.m⁻².s⁻¹.

Tabulka 2: Základní popisná statistika environmetálních parametrů během kultivace, kde n je počet měření a s.o. je směrodatná odchylka.

Začátek kultivace (CET)	7.1.2021 10:00
Konec kultivace (CET)	24.2.2021 9:00
Trvání kultivace [d]	47
Celková suma záření během kultivace [MJ m ⁻²]	35.67

	Teplota vzduchu [°C]	Teplota suspenze [°C]	Ozářenost [µmol m ⁻² s ⁻¹]	Denní suma záření [MJ m ⁻² d ⁻¹]
<i>n</i>	6907	6907	6907	49
Průměr ± s.o.	10.6 ± 3.5	9.4 ± 3.0	39 ± 72	0.73 ± 0.35
Medián	9.4	8.2	0	0.61
Minimum	6.6	5.0	0	0.10
Maximum	28.3	23.8	439	1.56

Růstová křivka byla hodnocena denně, měřením optické hustoty při 750 nm přístrojem Shimadzu UV-1650 PC v kyvetách s tloušťkou suspenze 1 cm, event. po ředění. Narostlá biomasa byla

sklizena odstředěním v odstředivce EVODOS 10 při 7000 otáček/min, zmražena na -20 °C a později lyofylována neboli vakuově odmražena při tlaku 0,05 hPa. Sklizeno bylo celkem 975 g sušiny po 47 dnech tj. $1,73 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, $0,135 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

- 5 Obsah nenasycených mastných kyselin stanovených v sušině kmenu *Chodatodesmus australis* CICALA 1131 je zobrazen v následující tabulce 3. Obsah celkových lipidů bylo na konci kultivace 13,4 %, což činilo po 47 dnech kultivace výnosy $0,17 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ čili $0,014 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Tabulka 3: Obsah mastných kyselin a lipidů při poloprovodní kultivaci *Chodatodesmus australis* a v laboratoři při teplotě <10 °C a nepřetržitém osvětlení LED 65 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a syčení CO_2 .

Procenta jednotlivých mastných kyselin v celkových lipidech													
Datum	% lipidů v sušině	16:4 ω 3	16:3 ω 3	16:1 ω 9	16:0	18:4 ω 3	18:2 ω 6	18:3 ω 3	18:1 ω 9	18:1 ω 7	18:0	suma PUFA	poměr ω 6 : ω 3
		hexadekat etraenová	hexadekat rienová	palmitol ejová	palmitová	stearidonová	linolová	α -linolenová	olejová	vakcenová	stearová	(% v sušině)	
Poloprovodní kultivace 2021													
14.01.2021	6,4	10,9	3,3	6,2	10,1	3,0	16,5	20,7	27,5	0,5	1,3	54,4	1:2,31
18.01.2021	7,3	14,6	4,2	5,0	9,3	3,3	17,4	19,9	24,1	0,8	1,4	59,4	1:2,43
21.01.2021	7,2	14,2	4,8	3,6	9,8	5,3	17,0	21,4	22,1	0,8	1,0	62,7	1:2,69
29.01.2021	8,7	16,2	5,6	4,2	7,0	5,8	16,3	25,3	17,6	1,1	0,9	69,2	1:3,24
02.02.2021	9,1	18,0	5,2	4,6	6,4	4,6	18,4	21,6	19,3	1,0	0,9	67,8	1:2,67
12.02.2021	11,8	18,9	5,0	4,5	7,4	4,3	19,4	20,8	17,8	0,9	1,0	68,4	1:2,53
24.02.2021	13,4	19,2	5,1	5,5	8,1	4,5	20,3	19,7	15,6	1,1	0,9	68,8	1:2,39
Laboratorní kultivace <10 °C, LED kontinuální osvětlení													
26.10.2019 -21.4.2020	7,7	11,5	2,8	4,9	11,5	3,9	13,5	21,5	28,3	0,9	1,2	53,2	1:2,9
26.10.2019 -5.1.2020	9,9	12,1	2,6	5,2	11,0	4,0	18,0	15,5	30,1	0,6	0,9	52,2	1:1,9

- Sušina biomasy roste i ke konci kultivace ve stacionární fázi růstové křivky a pokles růstu nebyl prokázán. Hodnota dosáhla $6,3 \text{ g.L}^{-1}$ obr. 5. Mikroskopický rozbor prokázal, že řasa dobře snáší mechanické namáhání odstředivým čerpadlem, takže může být pěstována v běžných typech kultivátorů, které se již běžně používají pro komerční produkci biomasy řas a sinic jako např.
- 5 *Spirulina* či *Chlorella*.

Sušina biomasy

- Sušina biomasy je stanovena vážkově 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.
- 10

Identifikace mastných kyselin

- 15 100 mg lyofilizované biomasy je zmýdleno 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 BF_3 -methanol a identifikovány pomocí GC-MS, tedy plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií, s detektorem iontová
- 20 past s ionizací nárazu elektronů. Vzorek je nastříknut do kapilární kolony s polární stacionární fází, $25 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,1 \mu\text{m}$ a pro eluci je použit teplotní gradient 5 min při 50°C , se zahříváním kolony rychlostí $10^\circ\text{C min}^{-1}$ do 240°C a izotermicky 15 min při 240°C . Nosným plynem je helium s průtokem $0,52 \text{ mL.min}^{-1}$. Všechna spektra jsou skenována v rozsahu 50 až 600 Da. Struktura methyl esterů je určena na základě retenčních časů, jejich fragmentace a srovnáním
- 25 hmotnostních spekter s hmotnostními spektry komerčně získaných standardů.

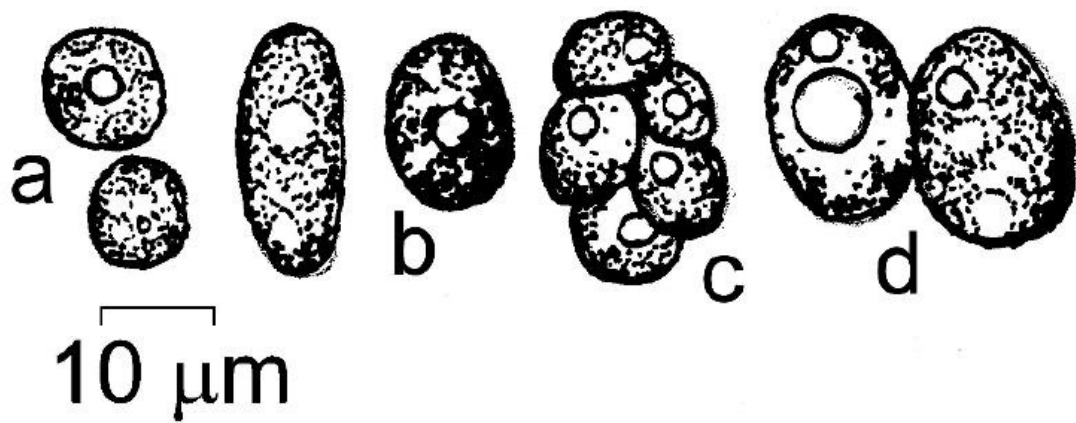
Průmyslová využitelnost

- 30 Směs olejů z řasy *Chodatodesmus australis* CCALA 1131 podle tohoto technického řešení lze využít jako potravinový doplněk s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin, konkrétně kyseliny linolové, kyseliny α -linolenové, stearidonové a kyseliny hexadekatrienové a hexadekatetraenové, jako přísadku diety člověka i zvířat, krmiva pro ryby a zooplankton v akvakulturách či v kosmetice.

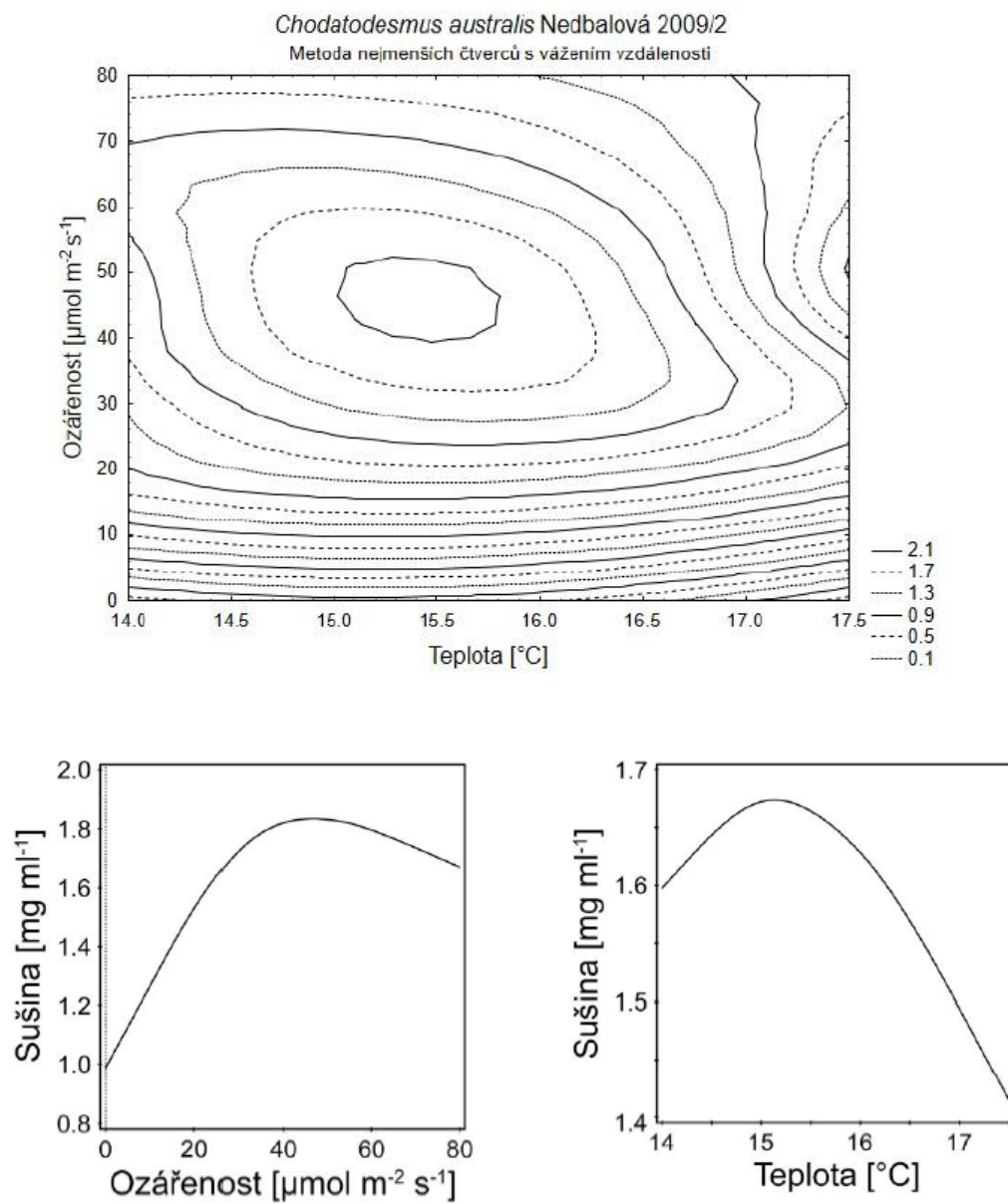
NÁROKY NA OCHRANU

1. Směs olejů pro potravinový doplněk z řasy *Chodatodesmus australis* uložené ve Sbírce autotrofních organismů Botanického ústavu AV ČR, Třeboň, Dukelská 135, pod přírůstkovým číslem CCALE 1131 *Chodatodesmus australis*, kmen Nedbalová 2009/2, **vyznačující se tím**, že celkový součet podílů nenasycených mastných kyselin ve směsi olejů je v rozmezí od 59,4 % do 69,2 % hmotn., přičemž směs obsahuje od 16,3 % do 20,3 % hmotn. kyseliny linolové, od 19,7 % do 25,3 % hmotn. kyseliny α -linolenové, od 15,6 % do 27,5 % hmotn. kyseliny olejové, od 3,3 % do 5,6 % hmotn. kyseliny hexadekatrienové a od 10,9 % do 19,2 % hmotn. kyseliny hexadekatetraenové.

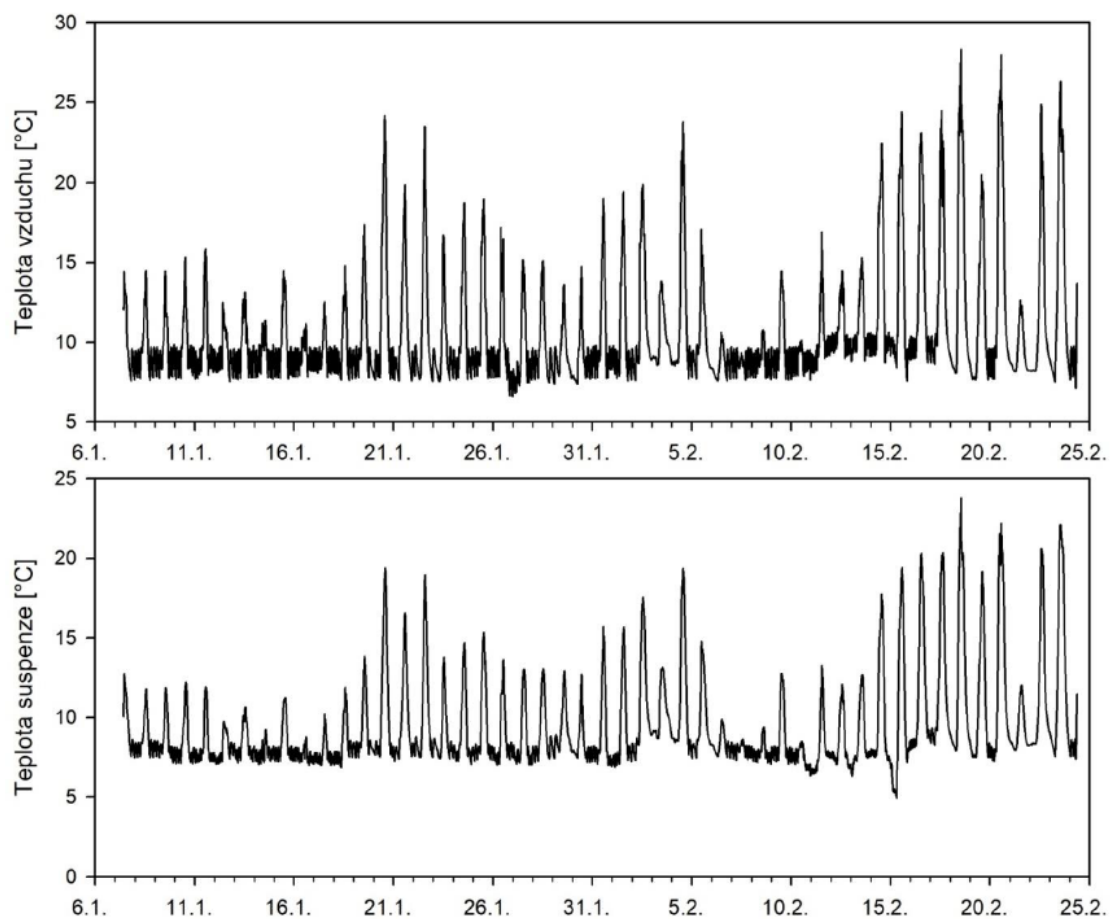
4 výkresy



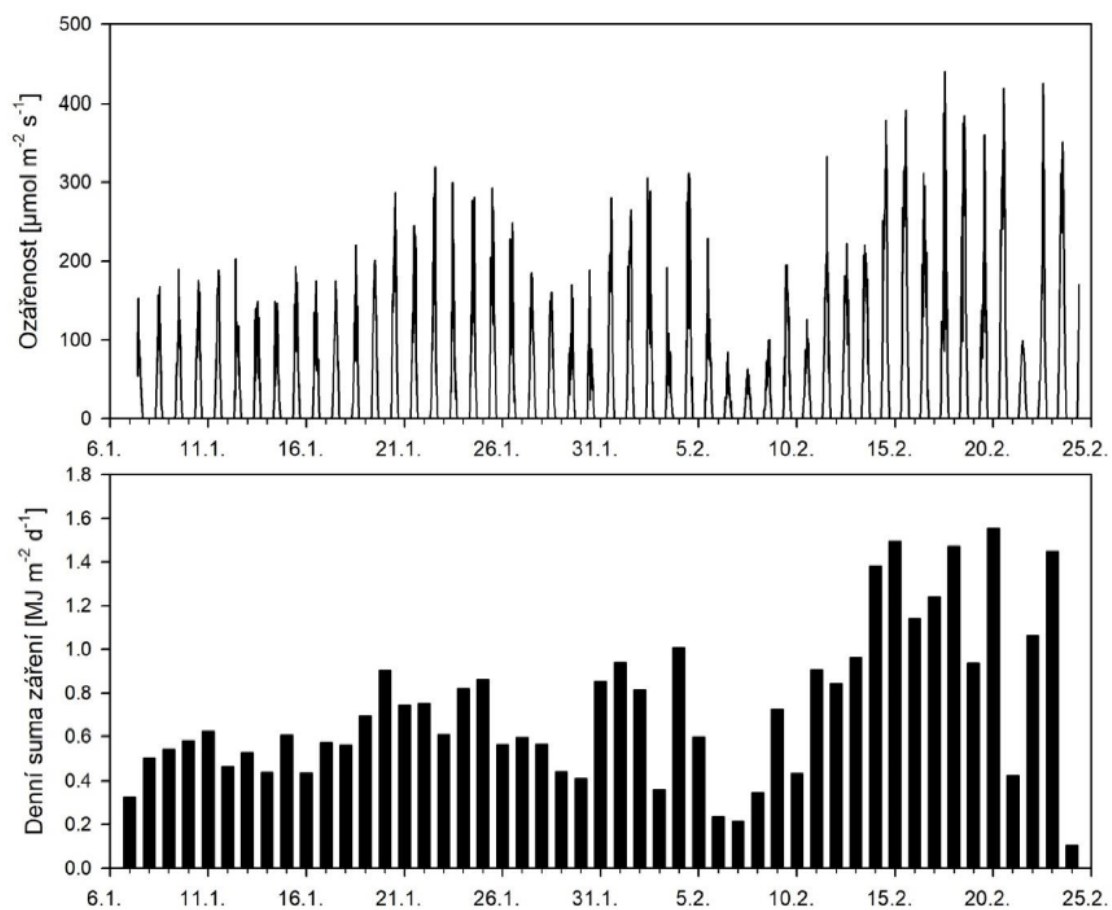
Obr. 1



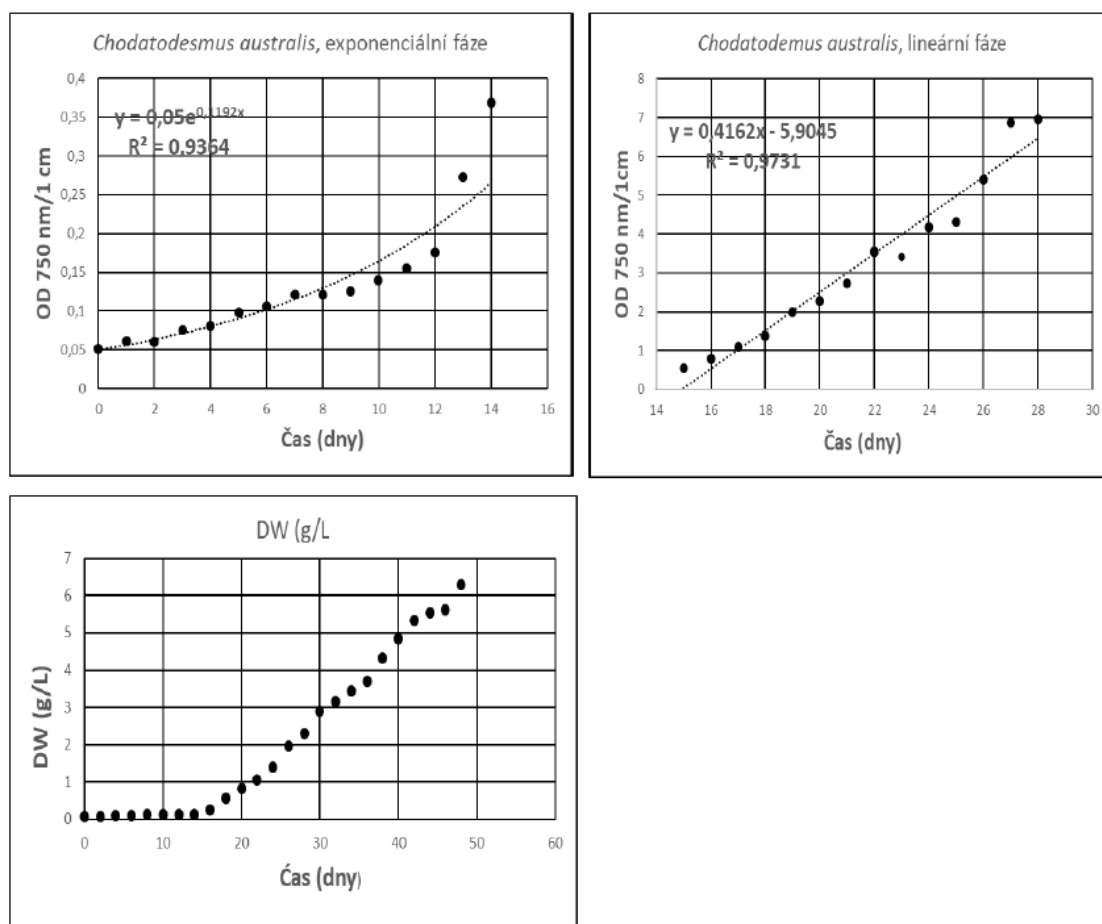
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5