

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 2017-331

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

*C12N 1/12* (2006.01)  
*C12P 7/64* (2006.01)  
*C12R 1/89* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



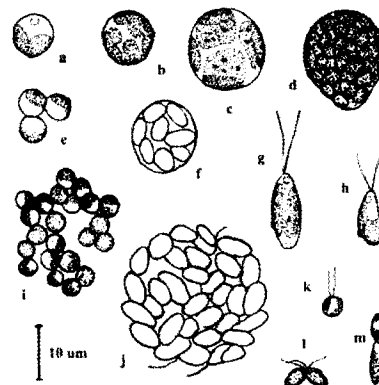
ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.06.2017**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **25.07.2018**  
(**Věstník č. 30/2018**)

(71) Přihlašovatel:  
Mikrobiologický ústav AV ČR v. v. i., Praha 4,  
Krč, CZ  
Botanický ústav AV ČR, v.v.i., Průhonice, CZ  
Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha  
1, Staré Město, CZ

(72) Původce:  
RNDr. Tomáš Řezanka, CSc., DSc., Praha 4,  
Chodov, CZ  
RNDr. Jaromír Lukavský, CSc., Třeboň, Třeboň I,  
CZ  
RNDr. doc. Vladislav Cepák, CSc., Třeboň, Třeboň  
I, CZ  
Mgr. Lenka Procházková, Praha 7, Holešovice, CZ

(74) Zástupce:  
PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Husova tř.  
1847/5, 370 01 České Budějovice 3



(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Produkční kmen řasy *Bracteacoccus bullatus* pro produkci olejů s obsahem esenciálních nenasycených mastných kyselin, způsob produkce těchto olejů a použití tohoto kmene pro průmyslovou produkci těchto olejů**

(57) Anotace:  
Produkční kmen řasy *Bracteacoccus bullatus* uložený ve Sbírce autotrofních organismů Botanického ústavu AV ČR, Třeboň, Dukelská 135, pod přírůstkovým číslem CCALA 1120: *Bracteacoccus bullatus*, kmen Cepák et Lukavský 2011/13 je využitelný jako zdroj pro průmyslovou produkci olejů s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny linolové a kyseliny  $\alpha$ -linolenové, kyseliny olejové a kyseliny cis-vakcenové, pro doplňky stravy člověka, zvířat či jako použití pro jiné aplikace. Vynález popisuje také způsob produkce olejů s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin v poloprovozním zařízení.

CZ 2017 - 331 A3

**Produkční kmen řasy *Bracteacoccus bullatus* pro produkci olejů s obsahem esenciálních nenasycených mastných kyselin, způsob produkce těchto olejů a použití tohoto kmene pro průmyslovou produkci těchto olejů**

Oblast techniky

Vynález se týká produkčního kmene řasy *Bracteacoccus bullatus*, produkujícího oleje s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin.

Dosavadní stav techniky

Esenciální mastné kyseliny jsou nepostradatelné pro správné fungování organismu, ale člověk a většina savců si tyto látky nedovede syntetizovat. Striktně vzato, jsou primárně esenciální pouze dvě mastné kyseliny, tj. kyselina  $\alpha$ -linolenová – polynenasycená mastná kyselina omega-3 ( $\omega$ -3) a kyselina linolová – polynenasycená mastná kyselina omega-6 ( $\omega$ -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. Tyto kyseliny neslouží jen jako zdroj energie, ale jsou prekurzory biologicky aktivních látek, z nichž lze např. jmenovat thromboxany nebo prostacykliny, látky kontrolující srážení krve.

Podle chemického složení, resp. struktury rozlišujeme několik skupin.  $\omega$ -3 Mastné kyseliny obsahují dvojnou vazbu na třetím atomu uhlíku od konce uhlovodíkového řetězce. Lze mezi ně řadit kyselinu  $\alpha$ -linolenovou se zkratkou ALA, tj.  $18:3\omega$ -3, která obsahuje osmnáct uhlíkových atomů a tři dvojně vazby, a kyselinu hexadecatetraenovou, tj.  $16:4\omega$ -3, která obsahuje šestnáct uhlíkových atomů a čtyři dvojně vazby.  $\omega$ -6 Polynenasycené mastné kyseliny mají poslední dvojnou vazbu v pozici  $\omega$ -6, což znamená šestý uhlík 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  $\gamma$ -linolenová se zkratkou GLA, tj.  $18:3\omega$ -6, která obsahuje osmnáct uhlíkových atomů a tři dvojně vazby.

Polynenasycená kyselina  $\alpha$ -linolenová je biosyntetizována kaskádou reakcí vycházející z kyseliny olejové za použití enzymů delta 12- a dále delta 15- desaturáz. Je součástí některých, takzvaných vysychavých rostlinných olejů. Polynenasycená kyselina hexadecatetraenová je biosyntetizována z kyseliny palmitolejové za pomoci enzymů desaturáz. Jediným zdrojem této kyseliny jsou pouze nižší fotosyntetizující mikroorganismy,

především mořské nebo i sladkovodní řasy, kde obsah této kyseliny dosahuje až desítek procent. 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.

Kyselina olejová je vyšší mononenasyčená kyselina, které ve své molekule obsahuje jednu dvojnou vazbu, a je obsažena v různých živočišných tucích a rostlinných olejích. Tato kyselina tvoří např. 55 až 80 % olivového oleje. Kakaové boby jí obsahují 35 %. Je prekursorem syntézy esenciální  $\alpha$ -linolenové kyseliny, tedy další významnou potenciální komponentou nutričních přípravků. Za další významnou mononenasyčenou mastnou kyselinou se považuje kyselina cis-vakcenová, která se běžně vyskytuje v tuku přežvýkavců, v savčím mléce, másele a jogurtu. 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. Při tomto předávání ale jsou zákonitě ztráty v jednotlivých stupních potravního řetězce, a proto je výhodné tyto mezistupně vynechat. Pro vegany, vegetariány a pro ty, co neradi jedí ryby, existuje zde také možnost náhrady v podobě kvalitních doplňků stravy.

Mastné kyseliny jsou cenné produkty, obvykle však jednotlivé organismy převážně produkují jen jednu skupinu mastných kyselin v závislosti na jejich biosyntetických schopnostech. Obsah žádaných látek je však pouze jednou z podmínek úspěšnosti biotechnologické produkce. Organismus pro venkovní kultivace musí dále snadno růst v daném zařízení, musí mít určitou odolnost proti technologickému zacházení, jako jsou např. střížné síly (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.

Řasy mají velký potenciál použití v biotechnologii díky své vysoké růstové rychlosti a možnosti průmyslového pěstování v suspenzních kulturách, které jsou snadno technicky ovladatelné a automatizovatelné. Navíc mohou být kultivovány i v lokalitách nevhodných pro klasické plodiny, protože nevyžadují úrodnou půdu, např. v pouštích, na střeších průmyslových objektů, atd. V kultivátorech s plně umělým světlem pak mohou být pěstovány kdekoli. Jsou známá řešení využívající kmeny řas pro produkci olejů s obsahem nenasycených mastných kyselin, kde je např. využito řasy rodu *Monoraphidium* k produkci

zejména kyseliny hexadecatetraenové a kyseliny stearidonové, jak je popsáno v CZ 306738. Podobně dokument CN 105296553 popisuje způsob kultivace řasy rodu *Monoraphidium* k produkci jiné kyseliny, a to kyseliny fulvonové použité následně pro přípravu bionafty. Nevýhody těchto řešení spočívají zejména v tom, že tyto řasy produkují pouze jeden, případně dva typy mastných kyselin a pěstování těchto řas tedy slouží k produkci olejů s obsahem jedné, případně dvou specifických mastných kyselin.

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  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3 PUFA, a to především díky velké spotřebě rostlinných olejů. Nadužívání rostlinných olejů posunulo poměr z ideálního poměru  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 1:1 až 1:0,25 dle doporučení Světové zdravotnické organizace (WHO) na téměř neuvěřitelných 1:0,1 až 1:0,03, což jsou hodnoty typické pro obyvatele Evropy a USA. 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, inzulinové rezistenci, vysokému krevnímu tlaku, trombóze, cukrovce, astmatu, nadváze, atd.

Jako potvrzení výše uvedených faktů, uvádíme příklady poměrů  $\omega$ -6 a  $\omega$ -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  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 1:0,40, *Parachlorella kessleri* (dříve *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  $\omega$ -3 PUFA. Mají tedy tento poměr daleko horší a téměř podobný běžným rostlinným olejům, např. řepkovému 1:0,5, sójovému 1:0,14, olivovému 1:0,07 nebo slunečnicovému oleji, který neobsahuje  $\omega$ -3 PUFA.

Úkolem vynálezu je najít vhodný organismus, který by byl schopen produkovat oleje s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin při kultivaci v otevřených systémech ve středoevropských podnebných podmínkách 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 běžné sinice

a řasy prakticky nepřirůstají, a který by rostl autotrofně a byl dostatečně rezistentní proti kontaminaci jinými řasami, sinicemi a bakteriemi.

### Podstata vynálezu

Tento úkol řeší kmen řasy *Bracteacoccus bullatus*, který ve smyslu tohoto vynálezu představuje produkční mikroorganismus pro získávání olejů s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Produkční kmen řasy *Bracteacoccus bullatus* je uložen ve sbírce Botanického ústavu AV ČR, Třeboň, Dukelská 135, pod přírůstkovým číslem CCALA 1120: *Bracteacoccus bullatus* kmen Cepák et Lukavský 2011/13. Vynález se dále zabývá průmyslovým použitím tohoto kmene a dále způsobem produkce olejů a obsahem nenasycených mastných kyselin v průmyslovém kmeni této řasy.

Tento kmen s výhodou produkuje oleje, ve kterých z celkového obsahu mastných kyselin představují nenasycené mastné kyseliny 53 % hmotn. Ty jsou považovány za esenciální tj. nezbytné, nebo alespoň příznivé pro zdraví obratlovců včetně člověka. Ve výhodném provedení kmen produkuje olej s obsahem vyšším než 18,3 % hmotn. kyseliny linolové, vyšším než 17,4 % hmotn. kyseliny  $\alpha$ -linolenové, vyšším než 22,6 % hmotn. kyseliny olejové a vyšším než 2,4 % hmotn. kyseliny vakcenové. Mononenasycená kyselina vakcenová snižuje obsah celkového i LDL cholesterolu a triglyceridů. Mononenasycená kyselina olejová je prekursorem kyseliny  $\alpha$ -linolenové. Kyselina linolová a kyselina  $\alpha$ -linolová představují polynenasycené esenciální mastné kyseliny. Kmen *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120 obsahuje dané PUFA  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 v poměru 1:1,16, čili je poměrně blízko ideálnímu poměru 1:1, který doporučuje WHO.

Buňky kmene *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120 jsou znázorněny na obr. 1, jak se jeví ve světelném mikroskopu. Jsou kulovité, řídce hruškovité, jak zobrazuje obr. 1d, s průměrem dospělých buněk 15 až 17  $\mu$ m, jak je znázorněno na obr. 1a až 1e a 1i, kde na obr. 1b jsou mladé buňky, na 1a a 1e jsou aplanospory. Chloroplastů je kolem deseti v dospělé buňce, jsou diskovité, nástěnné, bez pyrenoidu, jako zobrazuje obr. 1c. Rozmnožování je tvorbou většího počtu zoospor, kterých může být až 128, jak je znázorněno na obr. 1d, 1f, 1j, jsou kulovité, oválné až kapkovité, se dvěma stejnými bičíky vycházejícími z apexu, papila je nevýrazná, drobná kulovitá, červená oční skvrna je uložena v zadní části buňky na přístěnném chloroplastu, jejichž počet je 1 až 2 v zoosporách, což zobrazuje obr. 1g a 1h. Dále jsou v zoosporách přítomny dvě pulšující vakuoly, které jsou umístěny v apexu. Zoospory se začnou pohybovat již uvnitř mateřské buňky a někdy se uvolní a aktivně plavou.

Byla pozorována tendence k párování, čili mohou fungovat i jako gamety, jak je znázorněno na obr. 1l a 1m. Po nějaké době pohybu uvnitř mateřské buňky se zoospory přestanou pohybovat, což reprezentuje obr. 1j, ztratí bičíky, zakulatí se a postupně se mění na aplanospory, tedy rozmnožovací buňky, které mají vzhled zoospor, mají ještě nějaký čas červenou oční skvrnu a pulšující vakuoly, ale jsou nepohyblivé, protože ztratily bičíky, jak zobrazuje obr. 1a a 1e. Ty potom ztratí i oční skvrnu i pulšující vakuoly a podobají se své mateřské buňce, lze je proto považovat za autospory, tedy nepohlavní rozmnožovací buňky morfologicky podobné mateřské buňce o průměru 3 až 5  $\mu\text{m}$  na obr. 1i. Zoospory, aplanospory, autospory, dospělé buňky do sebe přecházejí plynule. Potom dorůstají do velikosti 15 až 17  $\mu\text{m}$ . Ve starých buňkách se postupně tvoří tmavě červená barviva.

Na základě analýzy jaderného molekulárního markeru ITS2 rDNA byl kmen CCALA 1120 určen jako *Bracteacoccus bullatus*. ITS2 - 'internal transcribed spacer' - je nekódující oblast mezi dvěma kódujícími úseky 5.8S a 26S rDNA a je používána jako vhodný marker pro studium blízkce příbuzných druhů dle Coleman 2003 (DOI:10.1016/S0168-9525(03)00118-5). Na obr. 2 je znázorněno porovnání sekundární struktury transkriptu ITS2 rDNA kmene CCALA 1120 s dalšími blízkce příbuznými 14 kmeny v rámci druhu *Bracteacoccus bullatus* zahrnutými ve studii Fučíkové a kolektivu (2012) (DOI:10.1127/0029-5035/2012/0067). Nukleotidové změny těchto kmenů oproti kmenu CCALA 1120 jsou znázorněny znaky podél sekundární struktury. Pokud se změna vyskytla pouze u některých kmenů, tak je příslušnost vyznačena malým písmenem v kurzívě (*a* - KF10, *b* - SAG 2032, *c* - KF65, *d* - KF22, *e* - KF72, *f* - KF34, *g* - KF3, *h* - CCALA 69). Sekvence ITS2 byla totožná mezi kmeny KF65, SAG 2317, UTEX 345, BCP-CNP2-VF8, BCP-UT8-26 a Broady 420, všechny tudíž označeny jako *c*. Dále tato sekvence byla identická mezi kmeny KF3 a BCP-CNP1-VF10, společné označení zde jako *g*. Sekundární struktura ITS2 porovnávaných kmenů vykazovala typické znaky pro eukaryotní organismy, jmenovitě přítomnost čtyř helixů (I. až IV.) a neshodu pyrimidinová báze - pyrimidinová báze na druhém helixu - označeno šipkami. Sekundární struktura ITS2 je spojená s tzv. CBC-druhovým konceptem (Coleman 2000, DOI: 10.1078/1434-4610-00002). CBC neboli kompenzační změna bází je taková změna na obou stranách struktury, které zajistí párování mezi nukleotidy. Pro kmeny *Bracteacoccus bullatus* nebyla nalezena žádná CBC, což naznačuje, že všechny tyto kmeny představují jeden druh.

Většina kmenů rodu *Bracteacoccus bullatus* byla izolována z půdy, kmen *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120 byl izolován ze sněhu v pohoří Sierra Nevada ve Španělsku v r. 2011. *Bracteacoccus bullatus* patří do třídy Chlorophyceae, tedy do třídy zelených řas, kde jako zásobní látka slouží olej nebo škrob. Obsah celkových olejů v biomase intenzivně rostoucí

kultury *Bracteacoccus bullatus* je i přes 30 % v sušině, nenasycené mastné kyseliny tvoří 45,8 % celkového množství mastných kyselin. Průběh teploty kultivačního média a intenzity fotosynteticky aktivního záření neboli FAR v rozmezí vlnové délky 400 až 700 nm jsou uvedeny na obr. 3. *Bracteacoccus bullatus* roste v širokém rozmezí teplot a záření, krátkodobě přežil teplotu -1 °C i +35 °C.

Předmětem vynálezu je také způsob produkce olejů s obsahem nenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny linolové, kyseliny  $\alpha$ -linolenové, kyseliny olejové a kyseliny vakcenové v produkčním kmeni řasy *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120. Podstata vynálezu spočívá v tom, že produkční kmen řasy se kultivuje v teplotním rozmezí 5 až 30 °C, s výhodou v teplotním rozmezí 10 až 16 °C. Protože daný kmen řasy *Bracteococcus bullatus* CCALA 1120 byl získán ze sněhu, jeho kultivace je možná i při nízkých teplotách. Kmen je psychrotolerantní, což znamená, že krátkodobé ochlazení i pod 0 °C mu nevádí. Typickým příkladem jsou jarní mrazíky, které řasa bez problému přežije, na rozdíl od kultur řas *Chlorella* a jim podobných, které při teplotě pod 0 °C zmrznou. Důvodem této odolnosti je zřejmě vysoký obsah nenasycených mastných kyselin v buňce.

Výhody produkčního kmene řasy *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120 podle tohoto vynálezu spočívají zejména ve schopnosti produkce olejů s vysokým obsahem polynenasycených a mononenasycených mastných kyselin, při kultivaci v otevřených systémech v středoevropských podnebných podmínkách po celý rok, tedy ve schopnosti růst i za nižších teplot a nižšího záření. Produkční kmen *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120 je schopen produkovat nenasycené mastné kyseliny i během chladného období, kdy běžné sinice a řasy prakticky nepřirůstají, 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.

#### Literatura

- Coleman A. W. (2000): The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. – *Protist* 151: 1–9. DOI: 10.1078/1434-4610-00002
- Coleman, A. W. (2003): ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. – *Trends Genet* 19: 370–375. DOI:10.1016/S0168-9525(03)00118-5

- Fučíková, K., Flechtner, V. R. & Lewis, L. A. (2012): Revision of the genus *Bracteacoccus* Tereg (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on a phylogenetic approach. – *Nova Hedwigia* 96: 15–59. DOI:10.1127/0029-5035/2012/0067
- Lang, I., Hodač, L., Friedl, T. & Feussner, I. (2011): Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. – *BMC Plant Biology* 11:124. DOI: 10.1186/1471-2229-11-124

### Objasnění výkresů

Uvedený vynález bude blíže objasněn na následujících vyobrazeních, kde:

- obr. 1 zobrazuje různá stádia životního cyklu kmene *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120 pozorovaná pod světelným mikroskopem; a – aplanospora s pulšující vakuolou; b – mladá buňka; c – dospělá buňka; d – mateřská dospělá buňka hruškovitého tvaru dělící se na zoospory; e – aplanospory se světločivnou skvrnou; f – buňka se zoosporami; g, h – zoospory; i – autospory; j – dospělá buňka se zoosporami; k – zoospora; l, m – kopulace gamet; měřítko 10  $\mu\text{m}$  platí pro všechny obrázky vyjma g, h, kde jsou rozměry 3x6  $\mu\text{m}$ ,
- obr. 2 zobrazuje srovnání sekundární struktury ITS2 rDNA transkriptu kmene CCALA 1120 s dalšími kmeny v rámci druhu *Bracteacoccus bullatus*,
- obr. 3 znázorňuje průběh intenzity FAR a teploty kultivačního média při venkovní kultivaci, 22. 3. až 1. 5. 2017, teploty jsou vyrovnány klouzavými průměry s krokem 1 den,
- obr. 4 znázorňuje průběh růstové křivky při venkovní kultivaci,
- obr. 5 zobrazuje tabulku obsahu mastných kyselin a lipidů při poloprovozní kultivaci *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120,
- obr. 6 znázorňuje tabulku složení zásobních roztoků pro přípravu média Z8, Fe-EDTA roztoku a Gaffronova roztoku mikroelementů,
- obr. 7 znázorňuje tabulku složení zásobních roztoků pro přípravu média SŠ1/2 a roztoku mikroelementů.



### Příklad uskutečnění vynálezu

Rozumí se, že dále popsané a zobrazené konkrétní případy uskutečnění vynálezu jsou představovány pro ilustraci, nikoliv jako omezení vynálezu na uvedené příklady. Odborníci znalí stavu techniky najdou nebo budou schopni zajistit za použití rutinního experimentování větší či menší počet ekvivalentů ke specifickým uskutečněním vynálezu, která jsou zde popsána. I tyto ekvivalenty budou zahrnuty v rozsahu následujících patentových nároků.

#### **Příprava inokula**

Kmen *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120 je uchováván ve Sběrce autotrofních organismů Botanického ústavu AV ČR v Třeboni jako rostoucí kultura ve zkumavce na šikmém agaru s médiem Z8, při cca 15 °C, pod zářivkovým osvětlením 46  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ . Z této kultury je kmen předpěstován vsádkovou, stacionární kultivací na kapalném médiu Z8, jehož složení je znázorněno v tabulce na obr. 6, ve skleněných lahvách, o objemu 2 L. Do 700 mL destilované vody je přidáno po 10 mL jednotlivých mikroelementů z obr. 6 ze zásobních roztoků, 0,2 mL Fe-EDTA roztoku a 0,08 mL Gaffronova roztoku mikroelementů, jejichž složení je taktéž zobrazeno na obr. 6. Celá směs je následně doplněna destilovanou vodou na objem 1000 mL. Dvoulitrové lahve nejprve obsahují 250 mL média a postupně po zhroustnutí suspenze je objem doplňován na celkový objem 2000 mL. Míchání suspenze a sycení CO<sub>2</sub> je zajištěno probubláváním nadbytkem vzduchu se 2 % obj. CO<sub>2</sub> pomocí trubičky zavedené na dno lahve, aerační směs je filtrována přes membránový bakteriální filtr Milipore (Midisart 2000, PT FE IN) s póry 0,2  $\mu\text{m}$ . 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 s energií 180  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ , což představuje cca pětinu sluneční intenzity. Na začátku kultivace a po každém zvýšení objemu je intenzita světla na prvních 5 dní snížena na 90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ , dokud kultura viditelně nezhoustne.

#### **Poloprovozní kultivace**

Poloprovozně byl kmen *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120 pěstován na plošině firmy BCS Engineering Brno, umístěné ve skleníku Botanického ústavu v Třeboni, tedy v klimatických podmínkách střední Evropy. Skleník byl přitápěn, pouze pokud vnitřní teplota klesala pod 8 °C. 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. Rozpěstování ze sbírkové kultury je provedeno analogicky, jako je popsáno výše.

Narostlé inokulum bylo převedeno celé do 150 L média SŠ1/2, které je pro vyšší obsah živin optimální pro průmyslovou kultivaci, jeho složení je znázorněno v tabulce na obr. 7. Pro velkoobjemovou kultivaci na plošině je možné odvážené chemikálie sypat přímo na plošinu a nechat jednotlivě rozpustit ve vodovodní vodě s otevřeným průtokem CO<sub>2</sub>. Do média je dávkován CO<sub>2</sub> zavedením před odstředivé čerpadlo pro rychlé vstřebání suspenzí řas a jeho koncentrace je regulována na 5 L.hod<sup>-1</sup>. Po celou dobu kultivace je teplota suspenze a intenzita FAR zaznamenávána v desetiminutových intervalech pomocí dataloggerů Minikin (EMS, Brno).

Řasa byla v poloprovozním měřítku pěstována 22. 3. až 1. 5. 2017. Obr. 3 zobrazuje teploty kultivačního média a intenzity fotosynteticky aktivního záření FAR. Teplota suspenze kolísala v rozmezí 5 až 30 °C, případně 35 °C, obvykle se pohybovala kolem 15 °C, aritmetický průměr byl 15,8 °C. Hodnoty FAR oscilovaly v rozmezí 0 až 1000 μmol.m<sup>-2</sup>.sec<sup>-1</sup>, případně 1700 μmol.m<sup>-2</sup>.sec<sup>-1</sup>. Obr. 4 zobrazuje průběh růstové křivky, při venkovní kultivaci. Růstová křivka byla hodnocena denně, měřením optické hustoty při 750 nm přístrojem Shimadzu UV-1650 PC v kyvetách s tloušťkou suspenze 1 cm, eventuálně po ředění. Narostlá biomasa byla sklizena odstředěním v odstředivce EVODOS 10 při 7000 otáček/min, zmrazena na -20 °C a později lyofylozována neboli vakuově odmrazena při tlaku 0,05 hPa. Sklizeno bylo celkem 1271 g sušiny po 40 dnech tj. 1,76 g.m<sup>-2</sup>.den<sup>-1</sup>.

Na objem suspenze je to 0,14 g. L<sup>-1</sup> . den<sup>-1</sup>. Obsah nenasycených mastných kyselin stanovených v sušině kmenu *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120 je zobrazen v tabulce na obr. 5. Při obsahu polynenasycených mastných kyselin, linolové (18,3 %) a α-linolenové (17,4 %) z celkového množství mastných kyselin (30 % sušiny) byla jejich produkce ALA = 0,15 a LA = ,16 g.m<sup>-2</sup>.den<sup>-1</sup>. 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. *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.

(mediat je)

### Identifikace mastných kyselin

100 mg lyofilizované biomasy je zmýdelněno 10 % roztokem KOH v metanolu při pokojové teplotě přes noc. Neutrální a bašické 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<sub>3</sub>-methanol a identifikovány pomocí GC-MS, tedy plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií, s detektorem iontová past s ionizací nárazu elektronů. Vzorek je nastříknut do kapilární kolony s polární stacionární fází, 25 m × 0,25 mm × 0,1 μm a pro eluci je použit teplotní gradient 5 min při 50 °C, se zahříváním kolony rychlostí 10 °C min<sup>-1</sup> do 240 °C a izotermicky 15 min při 240 °C. Nosným plynem je helium s průtokem 0,52 mL.min<sup>-1</sup>. Všechna spektra jsou skenována v rozsahu 50 až 600 Da. Struktura methyl esterů je určena na základě retenčních časů, jejich fragmentace a srovnáním hmotnostních spekter s hmotnostními spektry komerčně získaných standardů.

### Průmyslová využitelnost

Produkční kmen řasy *Bracteacoccus bullatus* CCALA 1120 podle tohoto vynálezu lze využít pro produkci olejů s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin, konkrétně kyseliny linolové a kyseliny α-linolové a mononenasycených mastných kyselin, konkrétně kyseliny olejové a kyseliny vakcenové, při běžných i nízkých kultivačních teplotách, jako přídavek diety člověka i zvířat, krmiva pro ryby a zooplankton v akvakulturách či v kosmetice.

~~7/10 1/12~~

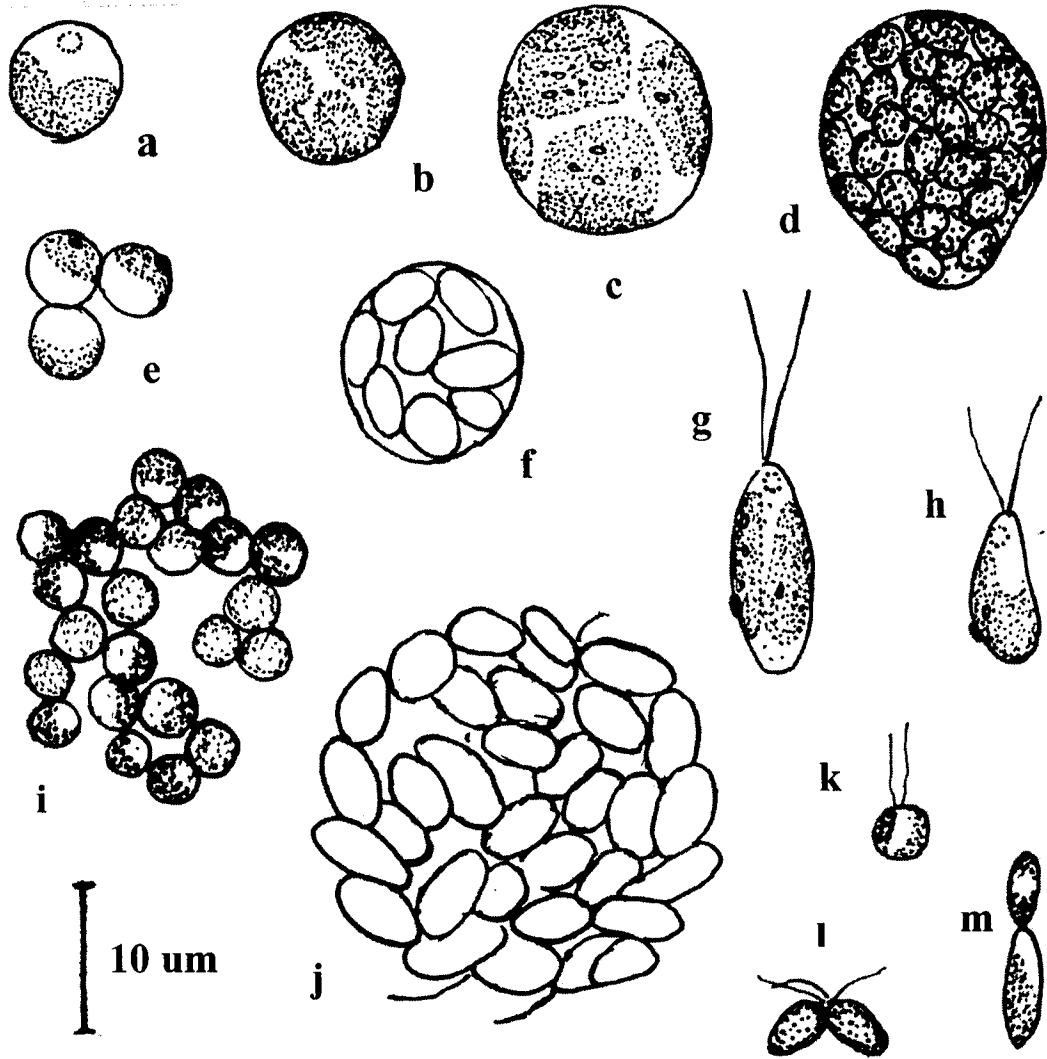
-14-

09.06.17

PV 2017-331

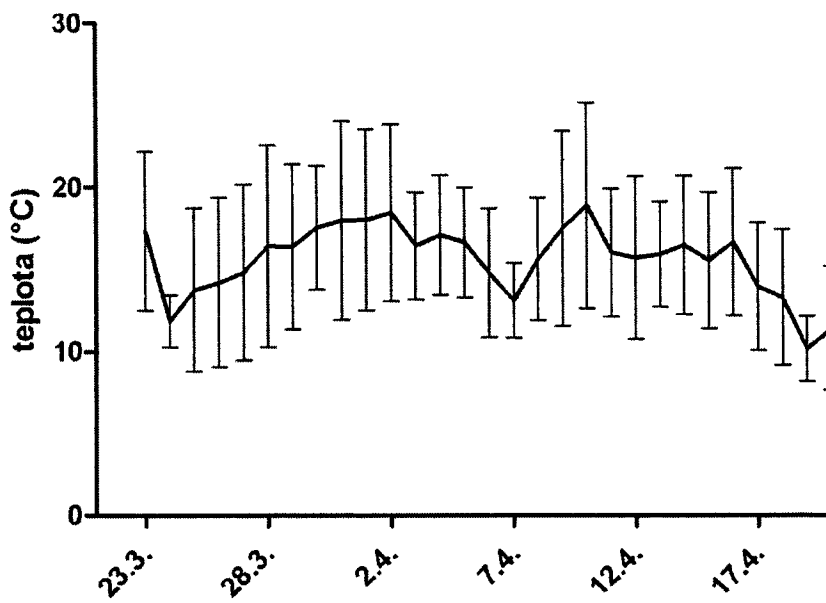
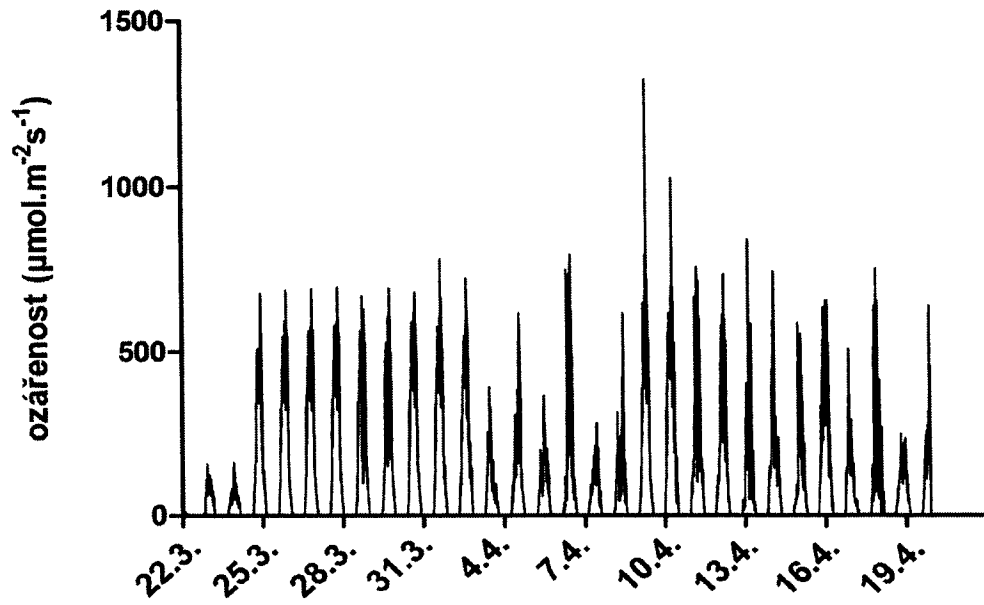
## PATENTOVÉ NÁROKY

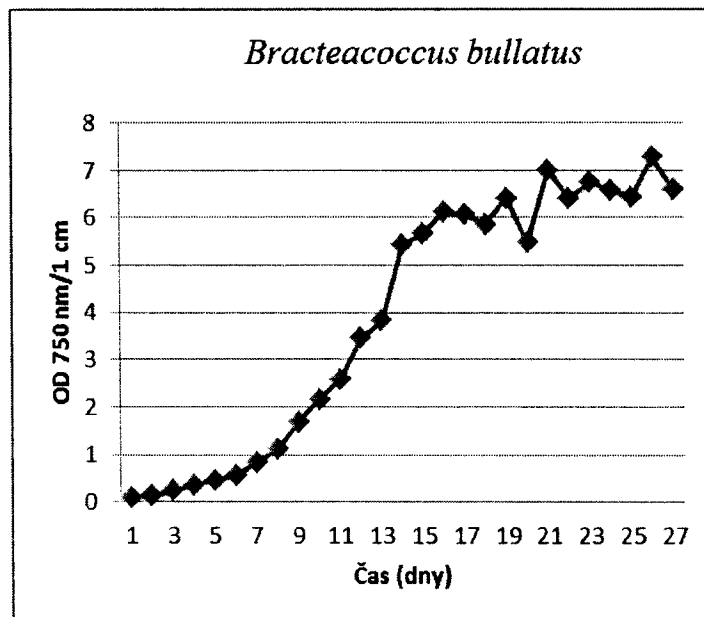
1. Produkční kmen řasy *Bracteacoccus bullatus* pro produkci olejů s obsahem nenasycených mastných kyselin uložený ve Sbírce autotrofních organismů Botanického ústavu AV ČR, Třeboň, Dukelská 135, pod přírůstkovým číslem CCALA 1120 *Bracteacoccus bullatus*, kmen Cepák et Lukavský 2011/13.
2. Produkční kmen řasy podle nároku 1, kde celkový součet podílů nenasycených mastných kyselin v produkovaném oleji je vyšší než 53 % hmotn.
3. Produkční kmen řasy podle nároku 1, kde produkované oleje obsahují více než 18,3 % hmotn. kyseliny linolové, více než 17,4 % hmotn. kyseliny  $\alpha$ -linolenové, více než 22,6 % hmotn. kyseliny olejové a více než 2,4 % hmotn. kyseliny vakcenové.
4. Použití produkčního kmene řasy *Bracteacoccus bullatus* podle některého z nároků 1 až 3 pro produkci olejů s obsahem polynenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny linolové a kyseliny  $\alpha$ -linolenové, kyseliny olejové a kyseliny vakcenové.
5. Způsob produkce olejů s obsahem nenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny linolové, kyseliny  $\alpha$ -linolenové, kyseliny olejové a kyseliny vakcenové v produkčním kmeni řasy podle některého z nároků 1 až 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že produkční kmen řasy se kultivuje v teplotním rozmezí 5 až 30 °C.
6. Způsob podle nároku 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že produkční kmen řasy se kultivuje s výhodou v teplotním rozmezí 10 až 16°C.



OBR. 1



OBR. 3

**OBR. 4**

Triviální název	Zkratka mastné kyseliny	[%]
palmitová	16:0	15,6
palmitoolejová	16:1 $\omega$ -7	3,1
	16:1 $\omega$ -9	1,2
	16:2 $\omega$ -6	6,0
	16:3 $\omega$ -3	5,2
	16:4 $\omega$ -3	5,1
stearová	18:0	2,1
olejová	18:1 $\omega$ -9	22,6
cis-vakcenová	18:1 $\omega$ -7	2,4
linolová	18:2 $\omega$ -6	18,3
$\gamma$ -linolenová	18:3 $\omega$ -6	0,4
$\alpha$ -linolenová	18:3 $\omega$ -3	17,4
stearidonová	18:4 $\omega$ -3	0,6

**OBR. 5**



**Medium Z8** (ZEHNDER in STAUB (1961): Ernährungphysiologisch-autökologische Untersuchung an den planktonischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie* 23: 82–198).

Sloučenina	Zásobní roztok (g.L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Objem do 1 L
NaNO <sub>3</sub>	46,7	10 mL
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	5,9	10 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,1	10 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,5	10 mL
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,1	10 mL
Fe-EDTA roztok	Viz níže	0,2 mL
Gaffronův roztok mikro prvků	Viz níže	0,08 mL

#### Fe-EDTA roztok

Sloučenina	Množství
HCl (35%)	2,2 mL
dH <sub>2</sub> O	250 mL
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	4,5 g
Na <sub>2</sub> EDTA	4,65 g

#### Gaffronův roztok mikro prvků

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

**Medium SŠ1/2 (ZACHLEDER, V. & ŠETLÍK, I. (1982): Effect of Irradiance on the Course of RNA Synthesis in the Cell Cycle of *Scenedesmus quadricauda*. Biologia Plantarum 24(5): 341–353)**

Do 970 ml H<sub>2</sub>O přidat po 20 mL každého zásobního roztoku a 3 mL 1N NaOH (=10g NaOH ve 250 mL H<sub>2</sub>O).

Sloučenina	Zásobní roztok	Objem do 1 L
(do 1 L H <sub>2</sub> O)		
<b>Zásobní roztok 1.</b>		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	98,8 g	20 ml
Stopové prvky viz níže	100 ml	
<b>Zásobní roztok 2.</b>		
KNO <sub>3</sub>	202,0 g	20 ml
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,1 g	
Fe-EDTA	1,8 g	
<b>Zásobní roztok 3.</b>		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34,0 g	20 ml

#### Stopové prvky

Sloučenina	Do 1 L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,086 g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,18 g
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,404 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,244 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,43 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,84 g

#### OBR. 7