



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

233 600

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita

(22) Přihlášeno 24 01 83

(21) (PV 443-83)

(51) Int. Cl.³ C 13 K 13/00

(40) Zveřejněno 13 08 84

(45) Vydáno 01 02 87

(75)

Autor vynálezu

DOUCHA JIŘÍ ing. CSc., TŘEBOŇ,

KOLINA JOSEF ing. CSc., PRAHA,

PEKÁRKOVÁ BLAŽENA prom. biol., ČESKÉ BUDĚJOVICE,

SMAŽÍK MIROSLAV ing., PRAHA,

ŠETLÍK IVAN RNDr. CSc., TŘEBOŇ

(54)

Způsob fotosyntetické produkce sacharidů, nespecificky značených stabilním izotopem uhlíku s vysokým stupněm obohacení

Vynález se týká způsobu fotosyntetické produkce sacharidů, nespecificky značených stabilním izotopem uhlíku s vysokým stupněm obohacení.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že se ke kultivaci použije dceřiných buněk synchronní populace řas s obsahem 2 až 4 % hmot. sacharidů na počátku buněčného cyklu, přičemž výrobní kultivace na světle probíhá až do začátku replikace deoxyribonukleové kyseliny, tj. po dobu 7 až 8 hodin při teplotě 28 až 29 °C, načež se zvýší kultivační teplota na 36 až 38 °C a kultivuje se dále po dobu 7 až 8 hodin. Tím se přeruší syntéza nukleových kyselin a bílkovin a dosáhne se výhradní syntézy sacharidů.

233 600

Vynález se týká způsobu fotosyntetické produkce sacharidů, nespecificky značených stabilním izotopem uhlíku s vysokým stupněm obohacení.

Vynález řeší způsob řízené intenzivní syntézy sacharidů, probíhající při fotosyntéze u populace chlorokokálních řas vhodného typu, přičemž zdrojem uhlíku je $^{13}\text{CO}_2$. Je dosaženo vysoké výtěžnosti požadovaných sloučenin a vysokého stupně jejich obohacení stabilním izotopem uhlíku.

Postupy přípravy různých organických sloučenin, značených radioaktivním ^{14}C nebo stabilním izotopem uhlíku ^{13}C pomocí autotrofních mikroorganismů, jsou popsány v řadě publikací /Bean et al. 1953, Bean et Hassid 1955, Dutton et Dagliesh 1956, Ellner 1959, Liebster et al. 1961, Tovey et al. 1964, Karpov et al. 1969, Lehman et Wöber 1977, Kollman et al. 1978, 1979/. Některé postupy jsou patentově chráněny /např. US patent 2602047, britský patent 1342098, francouzský patent 7208482, německý patent 2212092, československá autorská osvědčení 197918 a 199446/.

Převážná většina uváděných postupů se vyznačuje nízkou výtěžností vyráběných produktů nebo nízkou specifickou aktivitou /u ^{14}C sloučenin/ nebo nízkým stupněm obohacení /u ^{13}C sloučenin/. Většina popsaných způsobů výroby je náročná z hlediska výrobních operací i vlastních výrobních nákladů.

Tyto nedostatky odstraňuje v převážné míře způsob fotosyntetické produkce sacharidů, nespecificky značených stabilním izotopem uhlíku s vysokým stupněm obohacení podle vynále-

zu, jehož podstata spočívá v tom, že se ke kultivaci použije dceřiných buněk synchronní populace řas s obsahem 2 až 4 % hmotn^{ost} sacharidů na počátku buněčného cyklu, přičemž výrobní kultivace probíhá na světle po dobu 7 až 8 hodin růstu při teplotě 29 °C, načež se zvýší kultivační teplota na 36 až 38 °C a kultivuje se dále po dobu 7 až 8 hodin. Výrobní kultivace na světle probíhá za podmínek maximální specifické růstové rychlosti až do začátku replikace deoxyribonukleové kyseliny po 7. až 8. hodině světelné periody buněčného cyklu, kdy se zvýšením kultivační teploty na 36 až 38 °C přeruší syntéza nukleových kyselin a bílkovin a dosáhne se výhradní syntézy sacharidů. Syntéza probíhá v prostředí, kde výhradním zdrojem uhlíku je ^{13}C .

Podmínkou zdárného průběhu výrobní kultivace je, aby kultura řas, se kterou výroba začíná, měla požadované vlastnosti.

Předkultivace v atmosféře $^{12}\text{CO}_2$ a vlastní výrobní kultivace se provádějí v kultivačním zařízení, popsáném v autor-
ském osvědčení 1979/18.

Důležitou podmínkou úspěšného průběhu kultivace je použití synchronní populace, tj. populace, ve které jsou všechny řasové buňky ve stejném stádiu životního cyklu. Synchronní kultura umožňuje jednak snížit množství sacharidů před vlastní výrobní kultivací na minimum, což je jednou z podmínek dosažení vysokého obohacení požadovaných sloučenin izotopem ^{13}C , jednak provést zásah do metabolismu rostoucí populace buněk v okamžiku, který je pro dosažení co nejvyšší výtěžnosti a izotopového obohacení nejpriznivější, jednak dosáhnout během řízeného výrobního cyklu podstatně vyšší růstové rychlosti populace a celkové produkce biomasy ve srovnání s kulturou nesynchronní.

Výhody navrhovaného způsobu kultivace podle vynálezu spočívají v:

- krátké době kultivace a jednoduchosti výrobních operací;
- mimořádně vysoké výtěžnosti požadovaných sloučenin, neboť během řízené kultivace probíhá jejich výhradní syntéza;

- takovém zastoupení atomů ^{13}C v molekulách vyrobených sloučenin, odpovídající koncentraci tohoto izotopu v surovině, ze které se pro fotosyntézu získává.

Výroba sloučenin podle vynálezu je ekonomicky efektivní, neboť náklady na syntézu jednotkového množství produktu tvoří pouze 1 až 10 % hodnoty výsledného produktu, vyjádřené ve světových cenách.

Příklad

K výrobní kultivaci byla použita kultura chlorokokálních řas vhodného typu, přechovávaná ve zkumavkách na agarových půdách, obohacených minerálním živným roztokem při teplotě $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ozáření $10\text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR. FAR znamená fotosynteticky účinné záření, měřené spektrálně neselektivním čidlem, citlivým pouze v oblasti 400 až 720 nm. /Viz např. KUBÍN: Zdroje fotosynteticky účinného záření a metody jeho měření, Academia Praha 1973./

a) Příprava kultury a předvýrobní kultivace

Kultura se z agaru převede do tekutého živného roztoku následujícího složení: KNO_3 $2\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, KH_2PO_4 $680\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{Ca}/\text{NO}_3/2 \cdot 4\text{ H}_2\text{O}$ $10\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, chelatonát železitý-sodný $18,4\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ /obsah Fe^{+++} $5,6\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ /, H_3BO_3 $6,18\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a stopové těžké kovy: Cu $0,635\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, Mn $0,6\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, Mo $0,96\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, Co $0,59\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. K úpravě pH na hodnotu 6,8 se přidává do živného roztoku potřebné množství KOH .

V uvedeném roztoku se kultura pěstuje po dobu 10 hodin při ozáření $130\text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$, teplotě $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ a takové koncentraci $^{12}\text{CO}_2$ ve směsi se vzduchem, která odpovídá 2 % rozpuštěného CO_2 v suspenzi řas. Počáteční kultivační hustota řasové suspenze $A_{750} = 0,050$. A_{750} = optická hustota, měřená při vlnové délce 750 nm v 5 mm kyvetě na upraveném fotometru /SPECOL/. Znásobíme-li hodnotu optické hustoty koeficientem 0,50 /u dceřinných buněk synchronní populace/ nebo hodnotou 0,35 /u mateřských buněk/, získáme přibližnou hodnotu suché hmoty řas.

Po 10hodinové periodě ozáření se kultura na 18 hodin zatemní. V následujících cyklech se periody ozáření prodlužují a periody tmy zkracují tak, že po 4 až 5 přípravných synchro-

nizačních cyklech dosahují konečných hodnot 14 hodin ozáření a 14 hodin tmy. Aby se střední ozářenost populace během světelné periody cyklu nezměnila, probíhá kultivace na světle od druhého přípravného cyklu v průtokovém chemostatickém režimu při zředovací rychlosti $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$. V ustálené, plně synchronní populaci se optická hustota předvýrobní kultury pohybuje v rozmezí $A_{750} = 0,880$ až $1,150$.

Střední ozářenost populace $/E_c/$ se stanovuje z ozářenosti povrchu kultivační nádoby $/E_i/$ a z množství FAR, které projde kultivovanou vrstvou suspenze $/E_t/$:

$E_c = /E_i - E_t/ : \ln/E_i/E_t/$. /DOUCHA: Continuous Cultures of Algae, Algal Assays in Eutrophication Monitoring, Stuttgart 1978/.

Zředovací rychlost D se rovná u ustálené průtokové kultury specifické růstové rychlosti, μ . Ta se stanovuje nejčastěji z růstové křivky jednorázové kultury na základě doby zdvojení populace, t_d : $\mu = \ln 2/t_d$ /viz např. DOUCHA: Kandidátská disertace, MBÚ ČSAV Třeboň 1979/.

Během předkultivace a výrobní kultivace jsou sledovány následující údaje:

- a. teplota suspenze
- b. pH suspenze
- c. optická hustota suspenze
- d. koncentrace CO_2 , rozpuštěného v suspenzi a v plynném okruhu aparatury
- e. ozářenost povrchu kultivační nádoby a střední ozářenost populace
- f. stupeň synchronnosti populace

b) Výrobní kultivace

Hodinu před ukončením temné periody přípravného synchronního cyklu se výrobní kultivační válec naplní 850 ml anorganického živného roztoku, který se předtím zbaví veškerého fyzikálně rozpuštěného $^{12}\text{CO}_2$. Z plynného prostoru aparatury se vytěsni vzduch a nahradí se dusíkem, načež se tento uzavřený prostor částečně evakuuje /cca $0,07 \text{ MPa}/$. Potom se živný roztok ve válci nasytí $^{13}\text{CO}_2$, který vzniká ve vyvíječi přidá-

váním 1N HClO₄ do suspenze Ba¹³CO₃. Rovnovážný stav v živném roztoku rozpuštěného CO₂ s atmosférou obsahující 2 % CO₂ nastane asi po 30 minutách intenzivního probublávání.

Po nasycení se do kultivačního válce vpraví takové množství inokula dceřiných buněk řas, aby počáteční optická hustota suspenze, A₇₅₀, byla 0,350. Potom po dobu 8 hodin probíhá růst za autotrofních podmínek při teplotě 29 °C, kdy $\mu = 0,18 \text{ h}^{-1}$. Počáteční ozáření kultivačního povrchu je 120 W.m⁻², po čtvrté hodině kultivace se ozáření zvýší na 150 W.m⁻² a po osmé hodině na 180 W.m⁻². Po osmi hodinách, kdy dosahuje optická hustota A₇₅₀ hodnoty 1,600, se přeruší syntéza nukleových kyselin a bílkovin zvýšením kultivační teploty na 38 °C. Při této teplotě, při které probíhá výhradní syntéza sacharidů, se kultura pěstuje 8 hodin.

Po ukončení kultivace se suspenze řas ochladí na 2 °C a při této teplotě se centrifuguje. Získaná řasová biomasa i supernatant jsou výchozí surovinou pro další zpracování.

V následující Tabulce jsou množství škrobu a sacharózy v jednotce objemu řasové suspenze a hodnoty obohacení ¹³C uhlíkem v průběhu výrobního kultivačního cyklu. Zdrojem uhlíku pro biosyntézu je buď 90 % ¹³CO₂, nebo 99 % ¹³CO₂.

Tabulka

Hodiny kultiva- ce	Množství sacharidů v jednotce objemu, μg . ml ⁻¹		Izotopové obohacení produktu %			
			90 % ¹³ C ₀₂		99 % ¹³ C ₀₂	
	škrob	sacharóza	škrob	sacharóza	škrob	sacharóza
0	2,9	3,4	0	0	0	0
2	29,2	5,9	81,6	35,0	88,6	40,2
4	61,3	9,2	86,0	56,2	94,8	63,0
6	104,1	11,5	87,5	62,8	96,3	69,7
8	156,8	15,3	88,5	69,5	97,2	76,5
10	258,8	90,5	89,0	86,5	98,1	95,2
12	370,1	136,1	89,3	87,6	98,2	96,3
14	473,5	156,5	89,4	87,8	98,3	96,8
16	551,2	162,4	89,5	87,9	98,4	96,9

Průběh syntézy škrobu a sacharózy během synchronního cyklu výrobní kultivace, vyjádřený množstvím těchto sacharidů v jednotce objemu je uveden na obr. 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

233 800

Způsob fotosyntetické produkce sacharidů, nespecificky značených stabilním izotopem uhlíku s vysokým stupněm obohacení, vyznačující se tím, že se ke kultivaci použije dceřiných buněk synchronní populace řas s obsahem 2 až 4 % hmotnosti sacharidů na počátku buněčného cyklu, přičemž výrobní kultivace probíhá na světle po dobu 7 až 8 hodin růstu při teplotě 29 °C, načež se zvýší kultivační teplota na 36 až 38 °C a kultivuje se dále po dobu 7 až 8 hodin.

1 výkres

