



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

197 918

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 14 06 78
(21) PV 3886-78

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/12

(40) Zveřejněno 31 08 79
(45) Vydáno 01 6 82

(75)
Autor vynálezu DOUCHA JIŘÍ ing., TŘEBOŇ, ŠETLÍK IVAN RNDr. CSc., TŘEBOŇ, KOLINA JOSEF ing. CSc., PRAHA, PEKÁRKOVÁ BLAŽENA prom. zoolog., ČESKÉ BUDĚJOVICE, KUBÍN ŠTĚPÁN RNDr. CSc., TŘEBOŇ a SMAŽÍK MIROSLAV ing., PRAHA

(54)
Způsob kultivace chlorokokálních řas, zaměřený na intenzivní syntézu radioaktivních sacharidů o vysoké specifické aktivitě, značených radionuklidem ^{14}C

1

Vynález řeší způsob kultivace chlorokokálních řas vhodného typu, zaměřený na intenzivní syntézu radioaktivních sacharidů o vysoké specifické aktivitě, značených radionuklidem ^{14}C .

Příprava radioaktivních sloučenin, značených radionuklidem ^{14}C , pomocí autotrofních organismů, které využívají radioaktivní kysličník uhličitý jako zdroj uhlíku, se v současné době ve světě uplatňuje především při výrobě aminokyselin, bílkovin a nukleových kyselin. Některé postupy jsou předmětem patentů (viz např. čs. patent č. 100738, čs. patent č. 121808, franc. patent č. 7208482), jiné jsou utajeny. Rovněž postupy, používané u výrobců glycidů, značených radioizotopem ^{14}C , nejsou zveřejněny. Předpokládá se, že i zde se k výrobě požadovaných sloučenin používá autotrofních organismů.

Dosavadní způsob kultivace, kterého československý monopolní výrobce radioaktivních sloučenin - Ústav pro výzkum, výrobu a využití radioizotopů - při výrobě radioaktivních glycidů, značených radionuklidem ^{14}C , používá, se vyznačuje malou výtěžností cca 1 % z celkové inkorporované radioaktivity.

Předmětem vynálezu je způsob kultivace chlorokokálních řas vhodného typu, zaměřený na intenzivní syntézu radioaktivních sacharidů o vysoké specifické aktivitě, značených radionuklidem ^{14}C , jehož podstata spočívá v tom, že kultivace se provádí za přítomnosti specifického inhibitoru cykloheximidu. Ke kultivaci se použije populace dceřinných buněk

187 918

synchrónní kultury, při čemž tato populace prochází před zahájením výrobního cyklu prodlouženou temnou periodou cyklu. Při tomto uspořádání pokusu je inhibována syntéza nukleových kyselin a stimulována syntéza glycidů. Během jednorázové, pouze několikadenné kultivace, která je předpokladem pro přežití organismu, rostoucího v přítomnosti radioaktivního kysličníku uhlíčitýho jako jediného zdroje uhlíku, se dosáhne syntézy významného množství škrobu a sacharózy, a tím i vysoké specifické aktivity produktů.

Inhibitorem syntézy nukleových kyselin a bílkovin je cykloheximid. Fotosyntetická aktivita a růstová rychlost jsou stejné jako za optimálních kultivačních podmínek.

Podmínkou zdárného průběhu výrobní kultivace je, aby násada řas, se kterou se výroba začíná, měla požadované vlastnosti. Příprava násady včetně zařízení, ve kterém probíhá, je proto součástí popisovaného vynálezu.

Vzhledem k tomu, že odezva kultivované populace buněk na zásah do jejího metabolismu je různá v různých fázích života buňky, je pro dosažení vysokých výtěžků a získání produktu o vysoké specifické aktivitě nutné použít synchronní populace (tj. populace, ve které jsou všechny buňky ve stejném stádiu životního cyklu). Synchrónní kultura umožňuje rovněž regulovat množství glycidů, především škrobu, v buňkách před začátkem kultivace na $^{14}\text{CO}_2$. Toto startovní množství glycidů, které z hlediska dosažení vysokých specifických aktivit musí být co nejnižší, se reguluje jednak délkou temné periody synchrónního cyklu a teplotou, při které dělení mateřských buněk na buňky dceřinné probíhá jednak použitím specifických látek, které během temné periody cyklu cyklu aktivují působení enzymů, urychlujících štěpení glycidů.

Předkultivace v atmosféře $^{14}\text{CO}_2$ i vlastní výrob. kultivace se provádějí v kultivačním zařízení téhož typu. Sestává ze skleněného kultivačního válce s dvojitým pláštěm (meziprostorem protéká chladiivo, zajišťující optimální teplotu kultivované suspenze) o pracovním objemu 750 ml. V kultivačním prostoru je suspenze řas vystavena fotosynteticky účinnému záření, při čemž je intenzivně míchána a sycena kysličníkem uhlíčitým, probublávajícím suspenzi ve směsi CO_2 /vzduch.

Příslušenství výrobního kultivátoru sestává z

- ozařovacího tělesa U tvaru, osazeného dvěma lampami typu Nitrafot o celkovém příkonu 1000 W. Vnitřní strany tělesa jsou pokryty zrcadlovými plochami, rovněž odrazová zadní stěna je kryta zrcadlem. Přiložení osvětlovacího U tělesa k zadní zrcadlové stěně umožňuje úplné uzavření kultivačního válce v prostoru ozařovacího tělesa. Intenzita fotosynteticky účinného záření (FAR), dopadajícího na čelní stěnu kultivátoru, se měří fytoaktinometrem (tj. čidlem, neselektivně citlivým v oblasti fotosynteticky účinného záření v rozmezí 400 až 700 nm) a je plynule nastavitelná pomocí transformátoru, regulujícího vstupní napětí,

- vyvíječe $^{14}\text{CO}_2$, zapojeného do okruhu cirkulace směsi CO_2 /vzduch. $^{14}\text{CO}_2$ se uvolňuje ve vyvíječi ze suroviny, jíž je $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$, dávkováním kyseliny. Do cirkulačního okruhu je zařazen indikátor koncentrace $^{14}\text{CO}_2$ v plyné směsi, vlastní cirkulace směsi je zajištěna čerpadlem,

- absorpční nádoby na pohlcení $^{14}\text{CO}_2$, která se připojuje do okruhu atmosféry, cirkulující aparaturou, po ukončené kultivaci nebo kdykoliv je třeba kultivaci přerušit,

- vývěvy, připojené přes absorbér $^{14}\text{CO}_2$ na plyný prostor aparatury. Používá se jí pro vytvoření podtlaku, který indikuje těsnost aparatury a znemožňuje únik plyné směsi do vnějšího prostoru,

- chladicího zařízení, tvořeného ultratermostatem, zapojeným přes kontaktní teploměr v uzavřeném okruhu s kultivátorem.

Příklad provedení

K výrobní kultivaci se použije chlorokokální řasa *Chlorella vulgaris* BEIJERINCK, kmen OM - 12/1975, jejíž kmenová kultura se přechovává ve zkumavkách na šikmých agarrech, nasycených minerálním živným roztokem, při teplotě $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a intenzitě ozáření 10 W.m^{-2} FAR.

a) Příprava kultury

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

V uvedeném živném roztoku se kultura pěstuje v kultivačním válci o objemu 300 ml při ozáření 50 W.m^{-2} , teplotě $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ a takové koncentraci CO_2 ve směsi se vzduchem, která odpovídá 2 % rozpuštěného CO_2 v suspenzi až do hustoty začátku stacionární fáze růstové křivky (nejčastěji 5 dní). Takto připravená kultura, převedená do kultivačního válce výrobního typu, se synchronizuje. Synchronizace se provádí metodou střídání period světla a tmy (způsob provedení viz např. DOUCHA: Synchronous cultures; Algal Assays in Eutrophication Monitoring, Stuttgart 1978). Synchronní, po každém cyklu ředěná kultura se pěstuje v rozsahu optických hustot $+0,150$ (začátek světelné periody) až $1,200$ (po rozdělení mateřských buněk na buňky dceřinné) při ozáření FAR 150 W.m^{-2} , teplotě $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 2 % rozpuštěného CO_2 v suspenzi. Za těchto podmínek trvá světelná perioda synchronního cyklu 14 hodin, temná perioda 8 hodin a průměrná specifická růstová rychlost kultury $\bar{\mu} = 0,22\text{ h}^{-1}$. Po 3 až 4 cyklech je kultura připravena k výrobní kultivaci.

Během předkultivace i výrobní kultivace jsou průběžně sledovány a korigovány následující údaje:

teplota suspenze, pH suspenze, koncentrace CO_2 , rozpuštěného v suspenzi, optická hustota suspenze a intenzita FAR, dopadajícího na povrch kultivační kyvety.

Optická hustota se měří v 5 mm kyvetě při vlnové délce 750 nm na fotometru SPECOL. Znásobíme-li hodnotu optické hustoty koeficientem 0,65, dostaneme (v rozsahu používaných kultivačních hustot populace) přibližnou hodnotu sušiny řas.

b) Výrobní kultivace

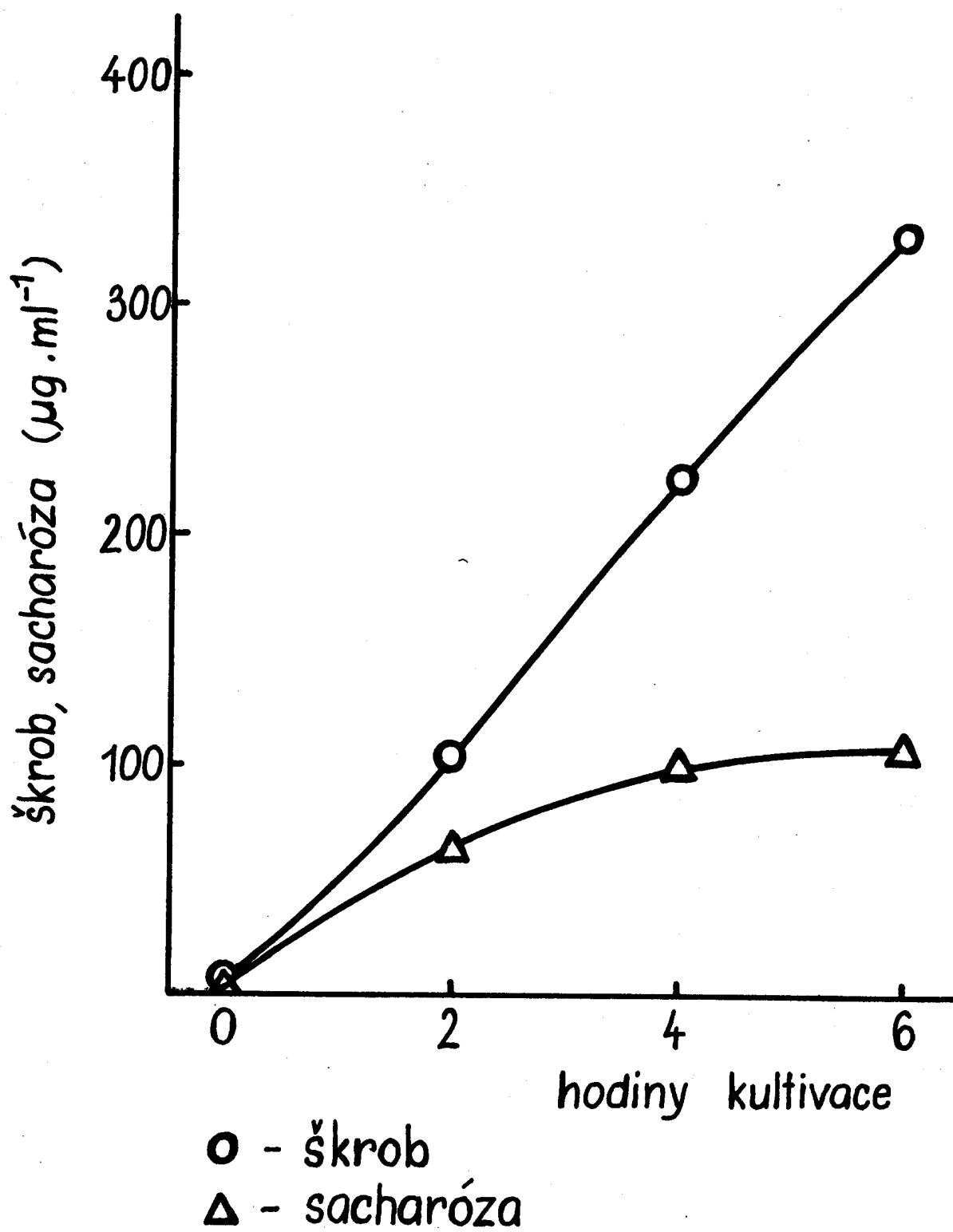
Temná perioda posledního předvýrobního synchronního cyklu probíhá po dobu 13 hodin. Hodinu před ukončením temné periody cyklu se ve výrobním kultivačním válci připraví 750 ml nového živného roztoku, který je zbaven veškerého fyzikálně rozpustného neradioaktivního kysličníku uhličitého. Do tohoto roztoku se dodá cykloheximid v množství 5 mg.l^{-1} . Potom se nasytí roztok radioaktivním kysličníkem uhličitým (rovnovážný stav v suspenzi rozpustného $^{14}\text{CO}_2$ s atmosférou, obsahující 2 % $^{14}\text{CO}_2$, nastane asi po 30 minutách intenzivního probublávání). Po nasycení se do válce vpraví takové množství promytého řasového inokula, aby startovní hustota suspenze byla $400 \text{ mg sušiny.ml}^{-1}$ a vlastní šestihodinový výrobní cyklus proběhne na světle. Počáteční ozáření 130 W.m^{-2} FAR se po čtvrté hodině zvýší na 180 W.m^{-2} FAR. Po ukončení kultivace se suspenze řas ochladí na 2°C a při této teplotě centrifuguje. Získaný řasový sediment je výchozím radioaktivním produktem pro vlastní zpracování.

Průběh syntézy škrobu a sacharózy při kultivaci, vyjádřený v $\mu\text{g/ml}$ suspenze a v % sušiny řas, je uveden na obrázku číslo 1 a 2. Specifická aktivita sacharózy a glukózy (po hydrolýze škrobu) v průběhu kultivace je uvedena na obr. 3.

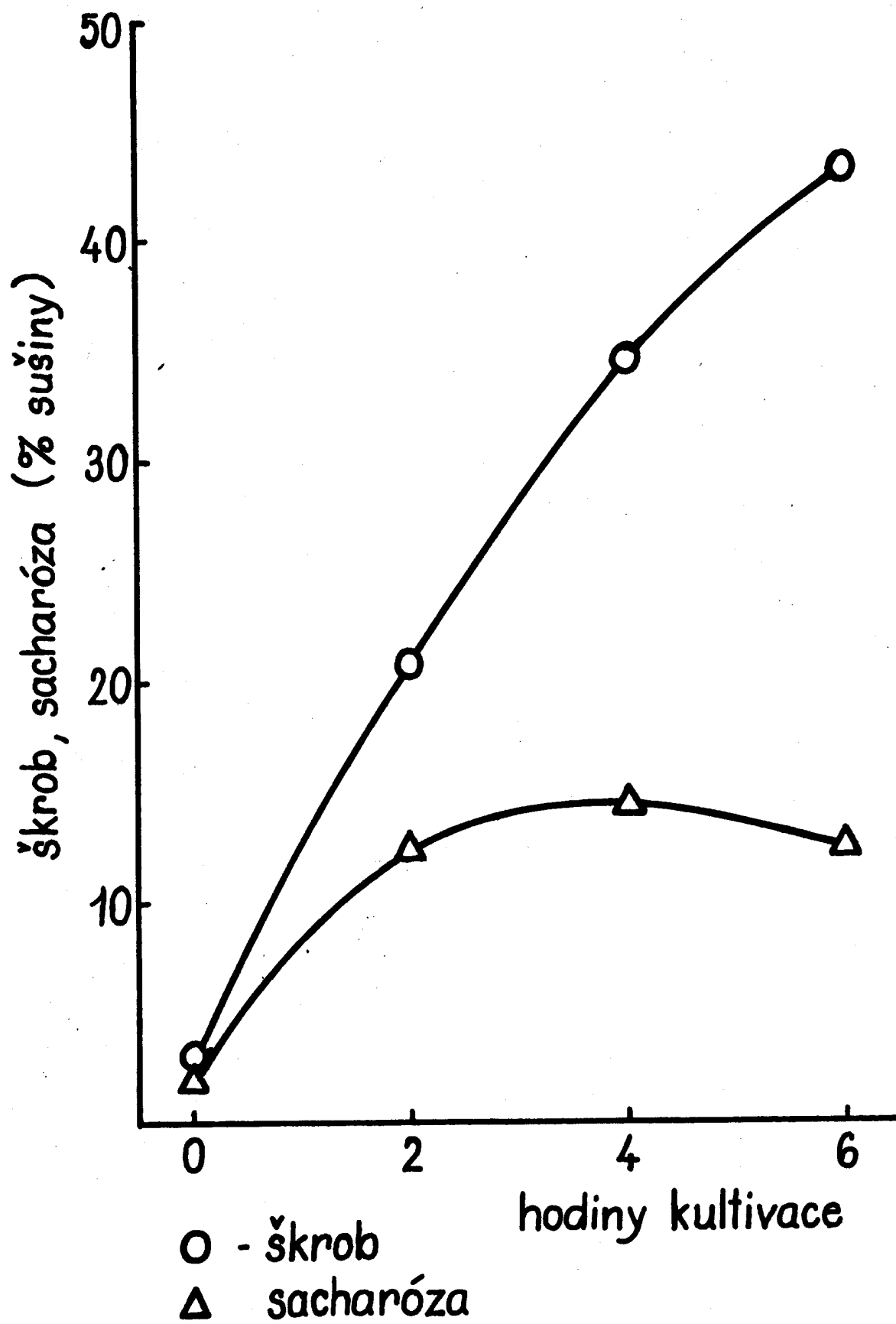
P ř e d m ě t v y n á l e z u

Způsob kultivace chlorokokálních řas, zaměřený na intenzivní syntézu radioaktivních sacharidů o vysoké specifické aktivitě, značených radionuklidem ^{14}C , vyznačený tím, že se kultivace provádí za přítomnosti specifického inhibitoru proteinové syntézy cykloheximidu a ke kultivaci se použije populace dceřinných buněk synchronní kultury, při čemž tato populace prochází před zahájením výrobního cyklu prodlouženou temnou periodou cyklu.

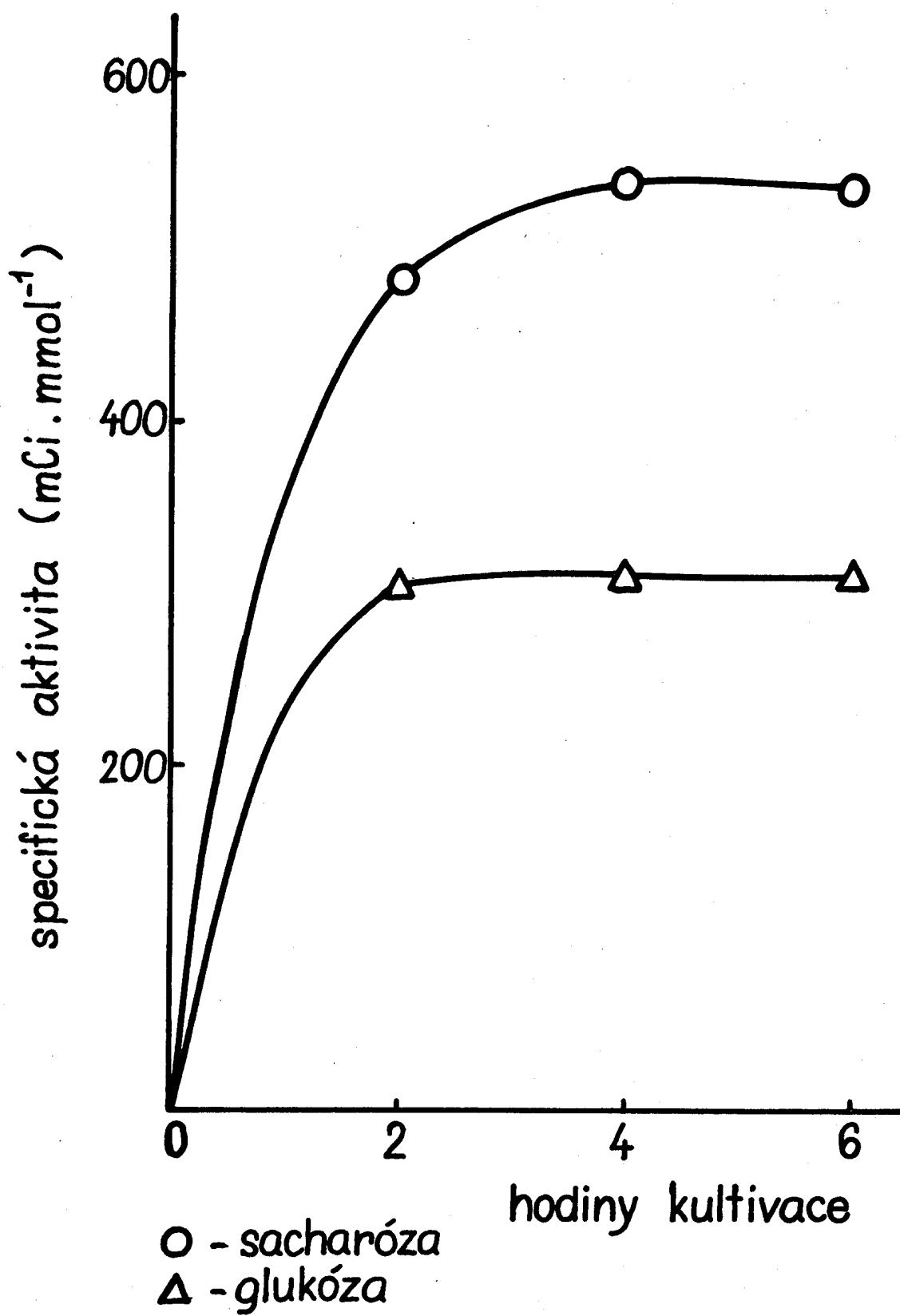
3 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3