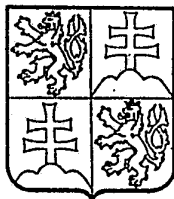


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATÍVNA
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

273 071

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
G 12 N 1/22

(21) PV 5343-88.T

(22) Prihlásené 28 07 88

(40) Zverejnené 12 07 90

(45) Vydané 30 03 92

(75) Autor vynálezu HINDÁK FRANTIŠEK RNDr. DrSc., BRATISLAVA,
PEKÁRKOVÁ BLAŽENA RNDr., ČESKÉ BUDĚJOVICE

(54)

Spôsob prípravy extracelulárneho polysacharidu a bunkovej biomasy synchronnou kultúrou riasy *Rhodella grisea*

(57) Účelom riešenia je zlepšiť spôsob prípravy extracelulárneho polysacharidu a bunkovej biomasy a zvýšiť ich výťažnosť. Uvedený účel sa dosiahne tak, že sa produkčná synchronna kultúra riasy *Rhodella grisea* s hustotou suspenzie 0,3 až 1,1 g.l⁻¹ suchej hmotnosti buniek sa kultivuje pri teplote 15 až 35 °C v aspon 3 cykloch 7 až 9 h svetla o intenzite aspon 70 W.m⁻² fotosyntetického aktívneho žiarenia a 15 až 17 h tmy, pričom sa naprodukovávaná biomasa zberá po tme. S výhodou sa kultivuje klon riasy *Rhodella grisea* HK 1983/1/7. Spôsob prípravy extracelulárneho polysacharidu a bunkovej biomasy synchronnou kultúrou riasy *Rhodella grisea* má použitie v poľnohospodárstve, farmaceutickom a kozmetickom priemysle.

Vynález sa týka spôsobu prípravy extracelulárneho polysacharidu a bunkovej biomasy synchronnou kultúrou riasy *Rhodella grisea* (Geitler) Billard et al.

Doteraz známe postupy produkcie extracelulárneho polysacharidu, ktorý sa podobá agaru a karageenanu morských stielkatých červených rias, používali jednobunkovú červenú riasu *Porphyridium*. Kultivačný postup s nepretržitou produkciou extracelulárneho polysacharidu pri použití slanomilného druhu *Porphyridium purpureum* opísali C. Guđin a D. Thomas. Bunky sa imobilizovali pevným nosičom z polyuretanu. K bunkám sa privádzal živný roztok s nízkym obsahom dusičnanov, do ktorého bunky kontinuálne produkovali viskózný extracelulárny polysacharid. Pri tomto spôsobe kultivácie netreba mechanicky separovať bunky zo živného roztoku [C. Guđin, D. Thomas: C.R. Acad. Sci. Paris Ser. III, 293, 35 (1981)]. Nevýhodou tohto spôsobu je nízka produkcia extracelulárneho polysacharidu a vysoká zasolenosť suspenzie. Pre sladkovodný druh *Porphyridium aeruginum* navrhol J. Ramus kontinuálny spôsob kultivácie, pri ktorom sa strieda kultivácia buniek v živnom roztoku obsahujúcom všetky potrebné živiny s kultiváciou v živnom roztoku bez dusičnanov, v ktorom bunky prestanú rásť a deliť sa, ale zvyšujú produkciu extracelulárneho polysacharidu. Po istom čase treba do živného roztoku doplniť dusičnany, aby sa predišlo nenávratnému poškodeniu fotosyntetického aparátu buniek [J. Ramus: Nova Hedwigia 83, 51 (1986)]. Nevýhodou tohto spôsobu je dlhšia kultivácia a práca s dvoma koncentraciami živného roztoku.

Mikroskopická červená riasa *Rhodella grisea* bola pôvodne nájdená v Neziderskom jazere a opísaná Geitlerom r. 1970 pod menom *Porphyrideum griseum*. Billard et al. r. 1988 ju previedli do rodu *Rhodella* ako *R. grisea*. Druhý nález tejto riasy pochádza z Československa, a to z termálneho bazéna v Piešťanoch. Izolovaný kmeň sa označil HK 1983/1. Veľmi riedka suspenzia tejto riasy sa naočkovala do Petriho misky s 1,5 hmot. % agaru obohateného živným roztokom. Z jednotlivých buniek riasy narástli na svetle klonové kolónie, na ktoré nebolo pôsobené mutagennými vplyvmi. Testovalo sa 20 klonov, z ktorých mal najvyššiu produkciu extracelulárneho polysacharidu klon HK 1983/1/7. Kultúra riasy *Rhodella grisea* bola uchovávaná v anorganickom živnom roztoku po 100 ml suspenzie v Erlenmeyerových bankách o objeme 250 ml. Zásobná kultúra nebola prebublávaná vzduchom a ani nebola tretaná, bola udržiavaná pri teplote 18 až 25 °C a pri intenzite svetla 20 až 30 W.m⁻² FAR (fotosynteticky aktívneho žiarenia).

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje spôsob prípravy extracelulárneho polysacharidu a bunkovej biomasy synchronnou kultúrou riasy *Rhodella grisea*, ktorého podstata spočíva v tom, že produkčná synchronná kultúra riasy *Rhodella grisea* s hustotou suspenzie 0,3 až 1,1 g.l⁻¹ suchej hmotnosti buniek sa kultivuje pri teplote 15 až 35 °C v aspoň 3 cykloch 7 až 9 h na svetle o intenzite aspoň 70 W.m⁻² fotosynteticky aktívneho žiarenia a 15 až 17 h v tme, pričom sa napestovaná biomasa zberá po tme. S výhodou sa kultivuje klon riasy *Rhodella grisea* HK 1983/1/7.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy extracelulárneho polysacharidu a bunkovej biomasy synchronnou kultúrou riasy *Rhodella grisea* oproti doterajším spôsobom je, že umožňuje rýchlejšiu produkciu oboch týchto komponentov a umožňuje použiť kultivátory s ľubovoľným objemom a tvarom pri kultiváciách v laboratóriách alebo pod holým nebom s využitím slnečného žiarenia ako zdroja svetelnej energie. Ďalšou výhodou je, že bunky použitého klonu riasy takmer nesedimentujú, nalepia sa na steny kultivátora a netvorí zhluky.

Príklad 1

Anorganický živný roztok o pH 7,5 až 8, ktorý obsahuje 500 mg.l⁻¹ dusičnanu draselného, 500 mg.l⁻¹ dusičnanu sodného, 500 mg.l⁻¹ hydrofosforečnanu draselného, 420 mg.l⁻¹ hydrouhličitanu sodného, 250 mg.l⁻¹ heptahydrátu síranu horečnatého, 18,5 mg.l⁻¹ hydrátu železito-sodnej soli kyseliny etyléndiamintetraoctovej (hydrát

chelatonátu železito-sodného), 11 mg.l^{-1} hexahydrátu chloridu vápenatého, $3,1 \text{ mg.l}^{-1}$ kyseliny boritej, $1,8 \text{ mg.l}^{-1}$ tetrahydrátu heptamolybdénanu hexaamonného, $1,4 \text{ mg.l}^{-1}$ heptahydrátu síranu kobaltnatého, $1,4 \text{ mg.l}^{-1}$ heptahydrátu síranu zinočnatého, $1,2 \text{ mg.l}^{-1}$ tetrahydrátu síranu manganatého, $1,2 \text{ mg.l}^{-1}$ pentahydrátu síranu meďnatého a stopové množstvo kyanokobalamínu (vitamínu B_{12}), sa inokuluje nesynchronnou zásobnou kultúrou na hustotu $0,3 \text{ g}$ suchej hmotnosti buniek v 1 litri suspenzie. Hustota sa stanoví pomocou optickej hustoty suspenzie meranej na fotometri pri vlnovej dĺžke 750 nm , s použitím predtým zisteného koeficientu prepočtu optickej hustoty suspenzie na približnú hodnotu jej suchej hmotnosti.

Suspenzia sa naleje do kultivátoru temperovaného neustále na teplotu 30°C a zatemní sa. V kultivátore sa suspenzia stále prebubláva zmesou vzduchu s prídavkom $2 \text{ obj. \%}$ oxidu uhličitého. Počas 16 h tmy sa časť buniek pripravených na delenie rozdelí, každá na dve rovnaké dcérske bunky. V prvej svetelnej perióde cyklu sa kultúra vystaví na biele svetlo o intenzite 70 W.m^{-2} FAR (fotosynteticky aktívneho žiarenia). Po 8 h sa kultúra zatemní na 16 h . Druhá svetelná perióda prebieha pri svetle 90 W.m^{-2} . Trvá opäť 8 h a nasleduje temná perióda 16 h . Suchá hmotnosť buniek sa po prvých dvoch cykloch zvýši na $0,8 \text{ g.l}^{-1}$. Nasleduje 5 cyklov, v ktorých sa automaticky riadi trvanie svetla a tmy v intervaloch $8 : 16 \text{ h}$ a hustota suspenzie - na kultivátore je umiestnený snímač, ktorý udržiava hustotu suspenzie v rozmedzí $0,9$ až 1 g.l^{-1} suchej hmotnosti buniek. Pri vyššej hustote suspenzie spustí snímač čerpadlo, ktoré dopraví do kultivátora také množstvo anorganického roztoku, že suspenzia sa zriedi na hustotu v rozmedzí $0,9$ až 1 g.l^{-1} suchej hmotnosti buniek. Rovnaký objem nadbytočnej suspenzie otečie trubicou z kultivátora. Svetelné periódy týchto automaticky riadených cyklov prebiehajú pri intenzite svetla 120 W.m^{-2} FAR ("biele" svetlo). Počas 3 h po zatemnení sa narastené materské bunky v synchronnej kultúre rozdelia na dve dcérske bunky.

Približne 95% buniek v synchronnej kultúre po 16 h tmy sú mladé dcérske bunky. Takáto kultúra sa nariedi na hustotu $0,45$ až $0,5 \text{ g.l}^{-1}$ suchej hmotnosti buniek a kultivuje sa pri teplote 30°C a intenzite svetla 100 W.m^{-2} FAR na čas 8 h . V priebehu svetelnej periódy sa suchá hmotnosť buniek zdvojnásobí. Nasleduje 16 h periódy tmy, počas ktorej bunky vylúčia do živného roztoku všetok polysacharid, syntetizovaný počas svetelnej periódy. Pred ďalšou periódou svetla sa z kultivátora odoberie polovica suspenzie o hustote $0,9$ až 1 g.l^{-1} suchej hmotnosti buniek. Zvyšok suspenzie v kultivátore sa zriedi anorganickým živným roztokom na polovičnú hustotu. Napostovaná suspenzia sa centrifuguje 15 minút pri 6 až $8 \cdot 10^3$ otáčkach za minútu. Sedimentované bunky sa rozmiešajú v čerstvom živnom roztoku a po 30 minútach miešania sa centrifugácia opakuje. V čerstvom živnom roztoku sa rozpustí extracelulárny polysacharid z vonkajších vrstiev bunkových obalov. Obidva supernatanty sa zlejú. Suchá hmotnosť polysacharidu rozpusteného v živnom roztoku predstavuje až 55% suchej hmotnosti celkovej produkovanej biomasy, t.j. súčtu suchých hmotností buniek a polysacharidu. Suspenzia o hustote 1 g.l^{-1} suchej hmotnosti buniek obsahuje až $1,2 \text{ g}$ polysacharidu v 1 litri . Uvedené hustoty sa použijú v kultivátoroch, v ktorých vrstva suspenzie nie je väčšia ako 2 cm .

Čistý extracelulárny polysacharid sa zo živného roztoku získa vo forme bielej, vo vode rozpustnej látky dialýzou a nasledovnou lyofilizáciou, alebo ako biela vláknitá, vo vode nerozpustná látka vyzrážaním acetónom, etylakoholom alebo 2-propanolom. Chemicky je polysacharid tvorený sacharidami (glukóza, galaktóza, xylóza, uronové kyseliny), ďalej obsahuje menšie množstvo proteínov a sulfátových skupín. Viskozita rozpusteného polysacharidu sa nemení pri zmenách pH; nepatrne sa zvyšuje pri zahriatí roztoku na 100°C .

Príklad 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že snímač reguluje hustotu suspenzie v synchronizačných cykloch na hodnotu 0,4 až 0,5 g.l⁻¹ suchej hmotnosti buniek pri intenzite svetla 80 W.m⁻² FAR a produkčné suspenzie rastú pri rovnakej intenzite svetla v rozmedzí hustôt 0,3 až 0,6 g.l⁻¹ suchej hmotnosti buniek. Suchá hmotnosť polysacharidu rozpusteného v živnom roztoku predstavuje až 60 % suchej hmotnosti celkovej biomasy, t.j. suspenzia o hustote 0,6 g.l⁻¹ suchej hmotnosti buniek obsahuje až 0,9 g polysacharidu v 1 litri. Tieto hustoty suspenzie sa použijú v kultivátoroch s vrstvou suspenzie 2 až 4 cm.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 2 s tým rozdielom, že sa použije kultivátor, v ktorom sú bunky počas svetelnej periódy stále na dennom svetle. Do kultivátora sa neleje synchronná kultúra pripravená v laboratóriu. Svetelná perióda končí, keď sa suchá hmotnosť buniek zdvojnásobí (kontrola fotometricky alebo gravimetricky); čo závisí od intenzity slnečného žiarenia. Teplota suspenzie sa udržiava na 30 °C. Suchá hmotnosť polysacharidu rozpusteného v živnom roztoku je obdobná ako v príklade 2.

Spôsob prípravy extracelulárneho polysacharidu a bunkovej biomasy synchronnou kultúrou riasou *Rhodella grisea* môže nájsť použitie v poľnohospodárstve, vo farmaceutickom a kozmetickom priemysle; polysacharid sa môže uplatniť napr. ako prostriedok redukujúci turbulenciu v kvapalinách, stabilizátor koloidov, spojivová alebo výplňová látka, súčasť kozmetických prípravkov, krémov ap.

Vedľajší produkt kultivácie je bunková biomasa, ktorá obsahuje asi 50 hmotnostných % proteínov, 20 % florideového škrobu a 20 % lipidov, je tiež zdrojom hydrofilných pigmentov (červeného fykoerytrínu a modrého fykocyanínu), lipofilných karotenoidov a chlorofylu, ktoré sa takisto dajú použiť vo farmatickom, kozmetickom a potravinárskom priemysle.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob prípravy extracelulárneho polysacharidu a bunkovej biomasy synchronnou kultúrou riasy *Rhodella grisea* v organickom živnom médiu, vyznačujúci sa tým, že produkčná synchronná kultúra riasy *Rhodella grisea* s hustotou suspenzie 0,3 až 1,1 g.l⁻¹ suchej hmotnosti buniek sa kultivuje pri teplote 15 až 35 °C v aspoň 3 cykloch 7 až 9 h svetla o intenzite aspoň 70 W.m⁻² fotosyntetického aktívneho žiarenia a 15 až 17 h tmy, pričom sa napestovaná biomasa zberá po tme.
2. Spôsob prípravy extracelulárneho polysacharidu a bunkovej biomasy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa kultivuje klon riasy *Rhodella grisea* HK 1982/1/7.