



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 199446

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 14.06.78
(21) (PV 3887 - 78)

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.

C 12 P 1/00

(40) Zveřejněno 31.10.79
(45) Vydáno 31.01.83

(75)
Autor vynálezu

D o u c h a Jiří ing.,
Š e t l í k Ivan RNDr. CSc., Třeboň,
K o l i n a Josef ing. CSc., Praha,
P e k á r k o v á Blažena prom.zoolog, České Budějovice,
V e n d l o v á Jitka ing. a
P l a n d e r Emil ing., Praha

(54)

ZPŮSOB KULTIVACE CHLOROKOKÁLNÍCH ŘAS ZAMĚŘENÝ NA INTENZIVNÍ
SYNTÉZU RADIOAKTIVNÍCH SACHARIDŮ O VYSOKÉ SPECIFICKÉ AKTIVITĚ,
ZNAČENÝCH RADIONUKLIDEM ^{14}C

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. patenty 100738, 121808, autorská osvědčení č. 1511, 1512, francouzský patent 7208482), jiné jsou tajeny. Rovněž postupy, používané u výrobců glycidů, značených radioisotopem ^{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 při výzkum, výrobu a využití radioisotopů 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 teploty 35 až 38 °C. Ke kultivaci se použije populace dcérinných buněk synchronní kultury, přičemž 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 několikahodinové kultivace, která je předpokladem pro přežití organismu, rostoucího v přítomnosti radioaktivního kysličníku uhličitého 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 vysoká pro daný kmen subletální teplota. 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 stadiu životního cyklu. Synchronní 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 synchronního cyklu a teplotou, při které dělení mateřských buněk na buňky dcérinné probíhá, jednak použitím specifických látek, které během temné periody cyklu aktivují působení enzymů, urychlujících štěpení glycidů.

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

Příslušenství výrobního kultivátoru sestává z :

- 1) ozařovacího tělesa U-tvaru, osazeného dvěma lampami typu Nitrafot o celkovém příkonu 1,000 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.

- 2) vyvíječe $^{14}\text{CO}_2$, zapojeného do okruhu cirkulace směsi CO_2 /vzduch. $^{14}\text{CO}_2$ se uvolňuje ve vyvíječi ze suroviny, kterou je $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$, dávkováním kyseliny. Do cirkulačního okruhu je zařazen indikátor koncentrace $^{14}\text{CO}_2$ v plynné směsi, vlastní cirkulace směsi je zajištěna čerpadlem;
- 3) absorpční nádoby na pohlčení $^{14}\text{CO}_2$, která se připojuje do okruhu atmosféry, cirkulující aparaturou, po ukončené kultivaci nebo kdykoliv je třeba kultivaci přerušit;
- 4) vývěvy, připojené přes absorbér $^{14}\text{CO}_2$ na plynný prostor aparatury. Používá se jí pro vytvoření podtlaku, který indikuje těsnost aparatury a zneumožňuje únik plynné směsi do vnějšího prostoru;
- 5) 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°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°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 připravena 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°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 3-4 cyklech je kultura připravena k výrobní kultivaci.

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

- 1) teplota suspenze
- 2) pH suspenze
- 3) koncentrace CO_2 , rozpuštěného v suspenzi
- 4) optická hustota suspenze
- 5) intenzita FAR, dopadající na povrch
- 6) kultivační květy.

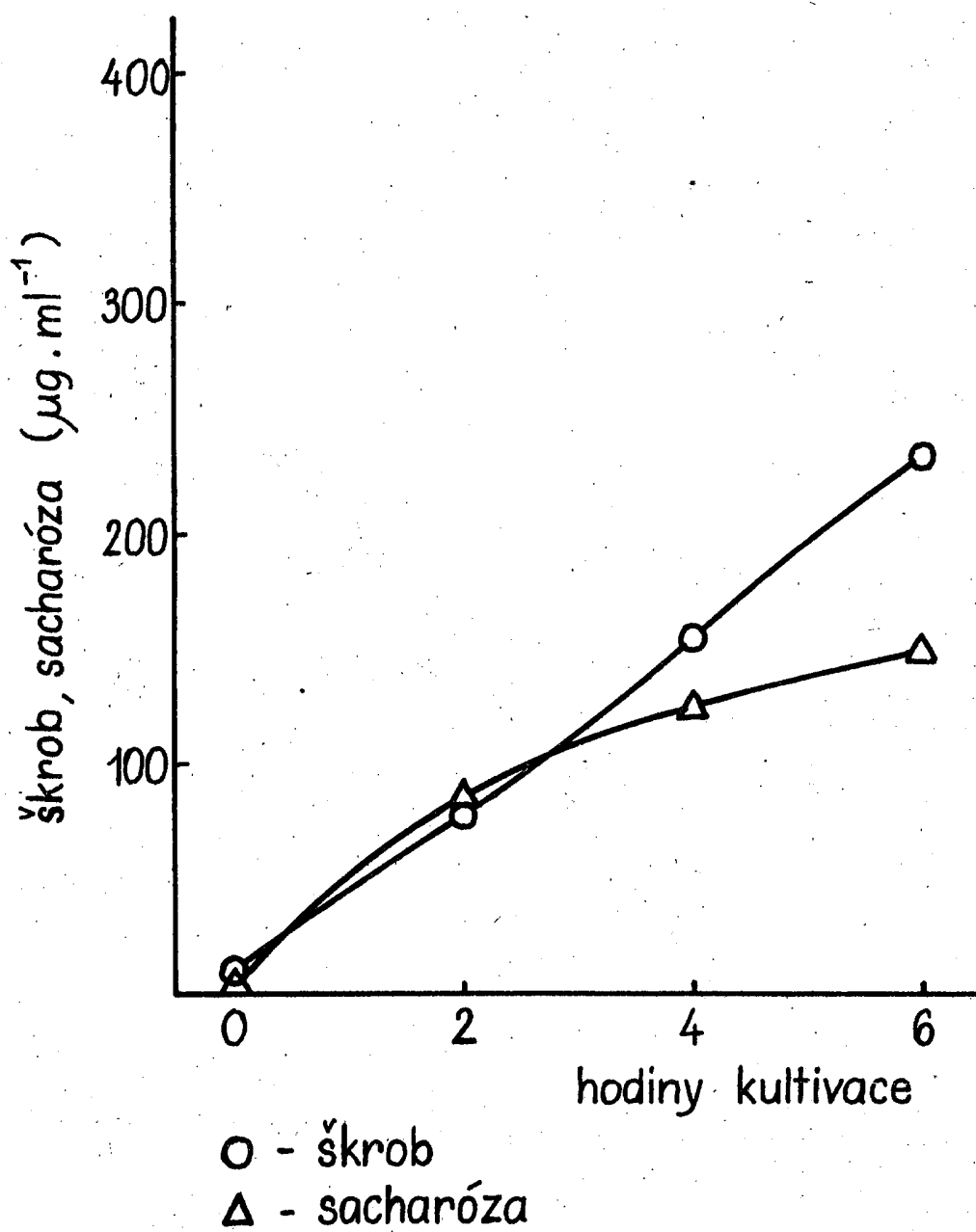
Optická hustota se měří v 5 mm květetě při vlnové délce 750 nm na fotometru SPECOL. Znásobíme-li hodnotu optické hustoty koeficientem 0,65, dostaneme -v rozsahu používaných kultivačních hustot populace- přibližnou hodnotu sušiny řas.

b) Výrobní kultivace

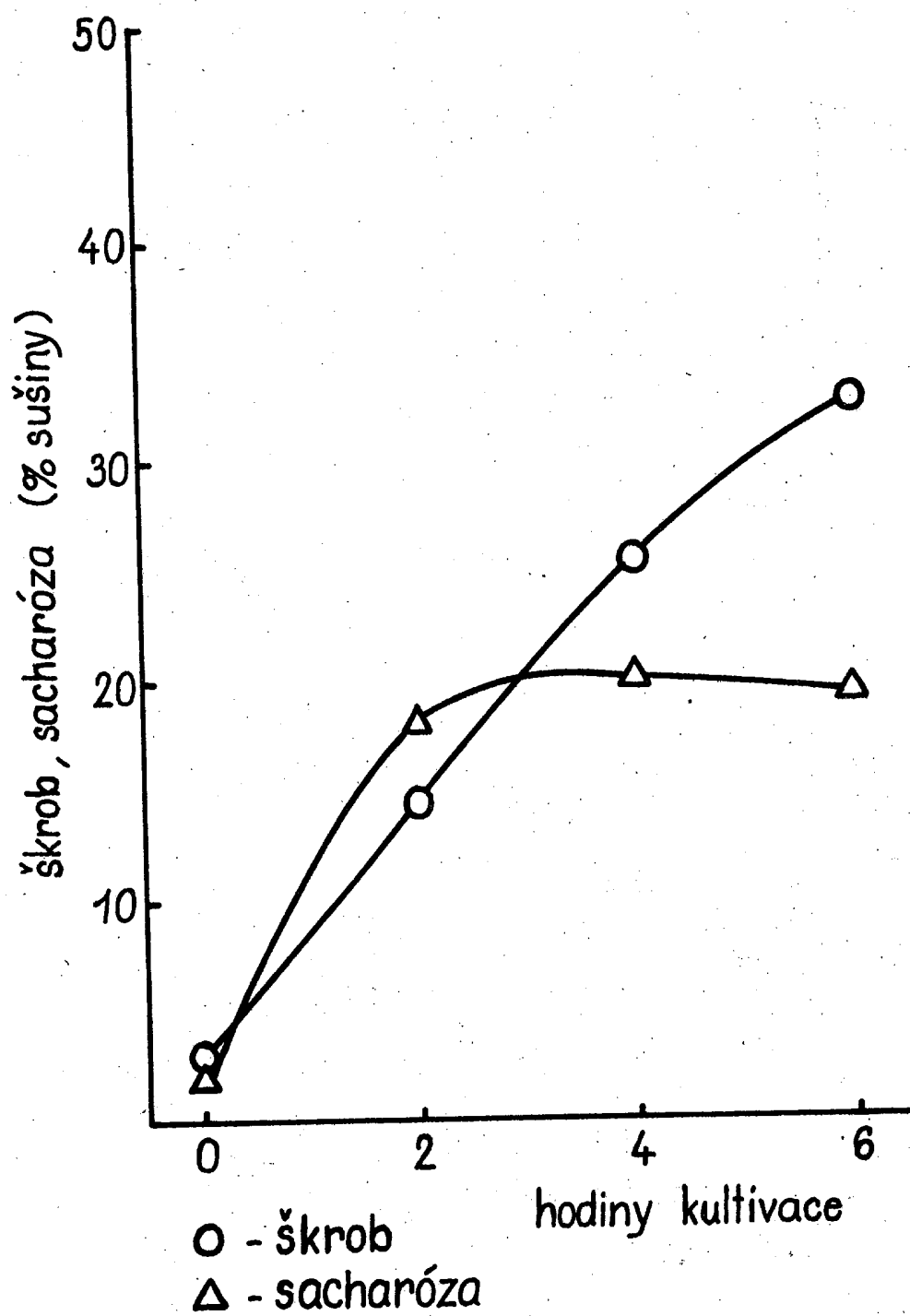
Temná perioda posledního předvýrobního synchronního cyklu probíhá po dobu 13 hodin. Hodinu před ukončením temné periody cyklu se ve výrobním kultivačním válci připraví 750 ml nového živného roztoku, který je zbaven veškerého fyzikálně rozpuštěného neradioaktivního kyslíčnicku uhličitého. Poté se nasatí roztok radioaktivním kyslíčnickem uhličitým (rovnovážný stav v suspensi rozpuštěného $^{14}\text{CO}_2$ 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 suspence byla 400 mg sušiny. ml^{-1} . Inhibice syntézy nukleových kyselin a proteinů, doprovázenou následnou intenzivní syntézou glycidů, se dosáhne kultivací při vysoké, pro daný kmen subletální, teplotě v rozmezí 35 až 38 °C, při které proběhne na světle vlastní šestihodinový výrobní cyklus. 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, vyjádřený v $\mu\text{g/ml}$ suspenze a v procentech sušiny řas, je uveden na obr. 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 ý n á l e z u

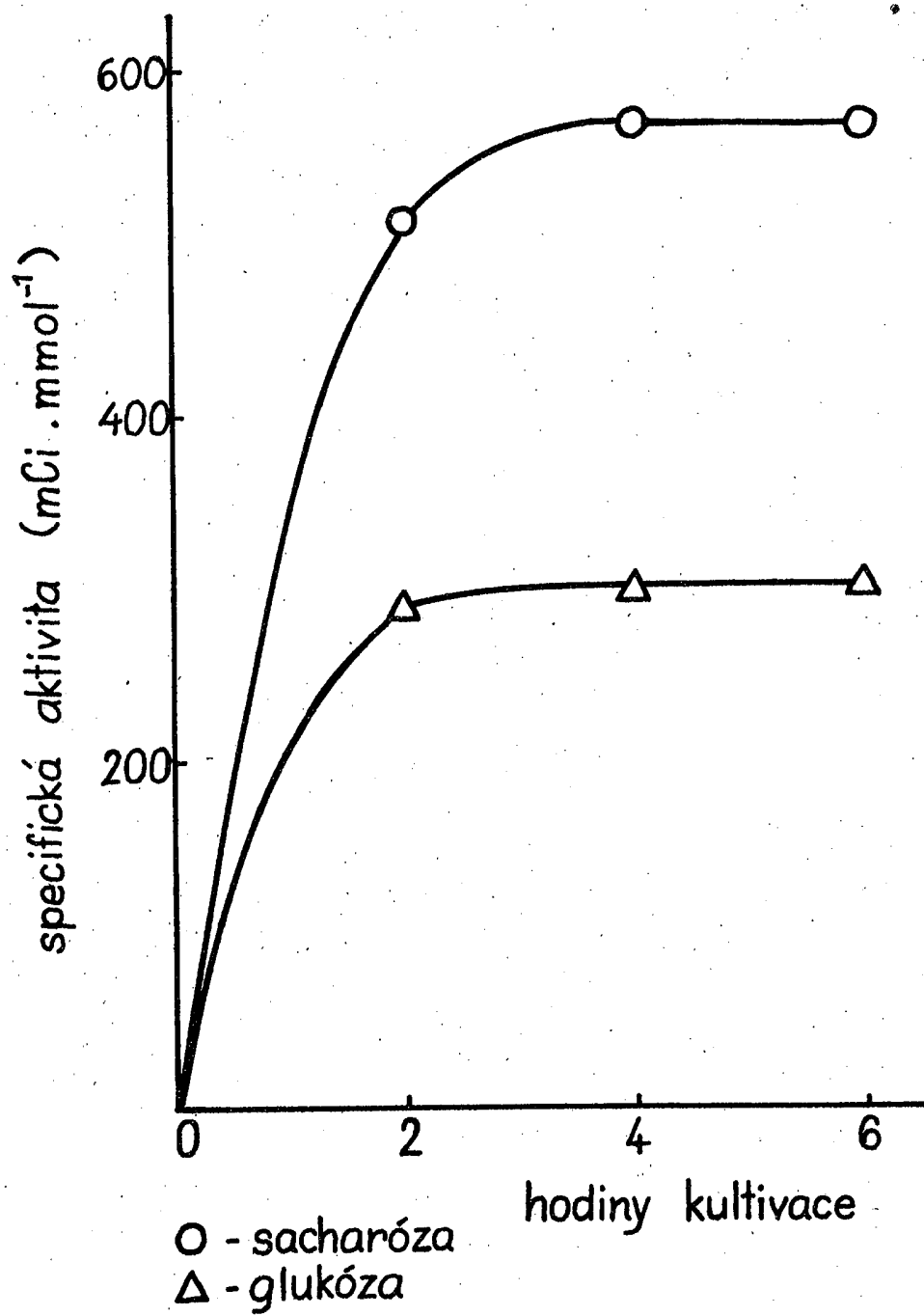
Způsob kultivace chlorokokálních řas, zaměřený na intenzivní syntézu radioaktivních sacharidů o vysoké specifické aktivitě, značených radionuklidem ^{14}C , vyznačený tím, že se kultivace provádí za teploty 35 až 38 °C a ke kultivaci se použije populace dcériných buněk synchronní kultury, přičemž tato populace prochází před zahájením výrobního cyklu prodlouženou temnou periodou cyklu.



Obr. 1



Obr. 2



obr. 3