



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

243 977

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 06 12 83
(21) PV 9132-83

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/12

(40) Zveřejněno 17 09 85
(45) Vydáno 01 07 88

(75)
Autor vynálezu

SULEK JOSEF RNDr. CSc., ČESKÉ BUDĚJOVICE;
TETÍK KAREL ing. CSc.;
NEČAS JOSEF RNDr. CSc., TŘEBONĚ

(54)

Průmyslový kmen mikroorganismu volvokální řasy
Chlamydomonas geitleri ETTL A-794, kmen N - Fl 1

Řešením je průmyslový kmen mikroorganismu volvokální řasy Chlamydomonas geitleri ETTL kmen N - Fl 1, produkující biomasu, schopný růstu za autotrofních podmínek kultivace, rozmnožující se výhradně nepohlavním způsobem, jehož vzorek je uložen ve Sbírce autotrofních organismů v Botanickém ústavu v Třeboni pod č. A - 794.

243 977

Vynález se týká průmyslového kmene mikroorganismu volvo-
kální řasy *Chlamydomonas geitleri* Ettl, kmen N - Fl 1. Vzorek
je uložen ve Sbírce autotrofních organismů v Botanickém ústa-
vu ČSAV v Třeboni pod č. A-794.

Charakteristiky standardních kultur *Chlamydomonas geitleri* Ettl
Morfologie a cytologie buněk: Buňky jsou vejčité nebo vejčité
elipsoidní, v přední části poněkud zúžené, na basi více zaku-
lacené, někdy poněkud asymetrické. Buněčný obal je pevný, ne-
příliš tlustý, zpravidla i na basální části buňky přiléhající
k protoplastu. Papila buňky je kýlovitá; její široká strana, mělce
vykrojená, leží v rovině bičíků, její úzká strana je zašpičatě-
lá. Oba bičíky jsou zhruba dvakrát tak dlouhé jako buňka; pomo-
cí nich se buňky pohybují po dráze tvaru šroubovice. Chloro-
plast je nástěnný, plášťovitý, u dospělých vegetativních buněk
členěný hlubokými zářezy v četné laloky; u zoospor a gamet je
hrncovitý, bez morfologické členitosti. Pyrenoid je uložen boč-
ně, v nápadně ztlustlině chloroplastu, přibližně v polovině dél-
ky buňky; je poměrně velký, elipsoidního, okrouhlého nebo i poly-
gonálního tvaru; často se vyskytuje v jeho těsné blízkosti ještě
jeden nebo dva další menší pyrenoidy. Stigma je svítivě červené,
umístěné v ekvatoriální rovině buňky nebo poněkud více vpředu.
Jádro se zřetelným jadérkem leží uprostřed přední poloviny buň-
ky. Pulsující vakuoly jsou dvě, poblíž papily v apikální části
buňky.

Délka buněk: 20 až 24 μm , šířka: 15 až 22 μm .

Rozmnožování: Nepohlavně se *Chlamydomonas geitleri* rozmnožuje zoosporami, jejichž počet 2, 4, 8 nebo 16 závisí na růstových podmínkách. Zoospory mají uvnitř obalu mateřské buňky charakteristické prostorové uspořádání; jsou uvolňovány rozšířeným otvorem, který vzniká v obalu mateřské buňky.

Pohlavní rozmnožování je isogamie. *Chlamydomonas geitleri* je druhem homothalickým. Vytvoření gamet lze indukovat radikálním snížením dusíku nebo fosforu v růstovém médiu nebo úplnou eliminací těchto živin. Zygoty, vzniklé splynutím gamet, nabývají kulovitého tvaru a vytvářejí si vlastní pevnou, poměrně tlustou stěnu s charakteristickou povrchovou skulpturou. Velikost zygot: 12 až 16 μm . Hromadně a rovnoměrně klíčí zygoty teprve poté, když jsou po třítýdenním a čtyřtýdenním zrání ve tmě přeneseny na světlo. Při jejich klíčení vznikají 4 zoospory /zřídka 8 zoospor/, které dorůstají ve vegetativní buňky, jež se mohou za příznivých růstových podmínek libovolně dlouho rozmnožovat nepohlavním způsobem.

Fyziologické, biochemické a kultivační charakteristiky:

Jsou dosud málo prostudovány /druh byl popsán v roce 1969/. *Chlamydomonas geitleri* dosahuje své optimální fotosynthetické produkce, jež je významná z hledisek praktické využitelnosti, při nižších ozářenítech /60 až 75 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR/ a nižších teplotách /21 až 25 $^{\circ}\text{C}$ /, než je tomu u chlorokokálních řas, dosud převážně používaných k produkčním velkokulturám. Chlorokokální řasy mají své optimum ozáření i teplot mnohem výše /120 až 150 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR, po příp. 150 až 200 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ FAR; 30 až 33 $^{\circ}\text{C}$, po příp. 35 až 38 $^{\circ}\text{C}$ /. Jsou tedy kultivace *Chlamydomonas geitleri* z hlediska přísunu energie mnohem méně náročné než kultivace chlorokokálních řas. Dále je u *Chlamydomonas geitleri* produkčně významná jeho schopnost růst a produkovat biomasu za poměrně nízkých teplot /10 až 20 $^{\circ}\text{C}$ /, kdy růst a produkce chlorokokálních řas se se snižující teplotou postupně zcela zastavuje. *Chlamydomonas geitleri* však není vhodný pro kultivaci při teplotách nad 30 $^{\circ}\text{C}$, neboť vyšší teploty brzdí a pak zcela blokují průběh buněčných cyklů; tímto se také tato řasa liší od mnohých druhů chlorokokálních řas.

Vyčerpání živin /zejména obsahu dusíku nebo fosforu z růstového media může u kultury *Chlamydomonas geitleri* indukovat

tvorbu gamet; vytvoření zygot ve větším měřítku může pak na delší dobu významně narušit kultivaci, neboť zygoty klíčí teprve až po delším časovém období. Při produkčních velkokulturách je proto nutno brát zřetel i na tyto skutečnosti.

K produkčně významným charakteristikám patří i výsledky chemické analýzy biomasy *Chlamydomonas geitleri*; biomasa obsahuje až 60 % bílkovin v sušině a má z nutričního hlediska příznivé složení aminokyselin /tab 2/.

Charakteristiky nového kmene *Chlamydomonas geitleri* ETTL

kmen N - FL 1

Původ nového kmene: Nový kmen je mutací původního kmene *Chlamydomonas geitleri* ETTL kmen ETTL 1966/3. Pochází z populace buněk, jež byla ovlivněna mutagenní dávkou N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu /10 μ g/ml, 15 minut/. Podnětem k jeho izolování byla nepohyblivost jeho buněk v tekutém médiu a odchylná délka jeho bičíků. Podrobnějším vyšetřením metodami světelné i elektronové mikroskopie a kultivačními testy byly pak zjištěny další jeho charakteristiky.

Morfologie a cytologie buněk: Morfologické a cytologické charakteristiky nového kmene převážně zapadají do rámce popisu standardních kultur *Chlamydomonas geitleri* ETTL. Nový kmen se od standardních kultur odlišuje především menší délkou bičíků / $\frac{1}{5}$ až $\frac{3}{5}$ délky buňky/, jejich omezeným pohybem a - zřejmě v důsledku toho - neschopností normálního pohybu buněk po šroubovicové dráze, charakteristického pro druhy rodu *Chlamydomonas*; rudimentární bičíky nového kmene jsou schopny uvést buňku pouze do pomalého, trhaného pohybu na místě. Tvar buněk se v řídkých kulturách od původního kmene neliší; v hustých kulturách se však tvar buňky výrazně mění na protáhlý.

Srovnání tvarového indexu /poměr délky buňky k šířce buňky/ nového kmene v řídkých a hustých kulturách je uvedeno v tab.1.

Rozmnožování: Nepohlavní rozmnožování nového kmene se děje zoosporami podobně jako u výchozího kmene, zoospory jsou však nepohyblivé stejně jako dospělé buňky. V hustých kulturách jsou i zoospory podlouhlého tvaru a způsob jejich řazení v obalu mateřské buňky je odlišný od původního kmene.

V řídkých kulturách je jejich uložení v mateřském obalu stejné

jako u výchozího kmene.

Pohlavní rozmnožování u nového kmene neprobíhá; ať již se působí ve směru indukce gametogenese snížením obsahu nebo úplnou eliminací dusíku nebo fosforu z růstového média kultury, nedochází ani ke shlukování buněk, ani k jejich párování, fusi a vytvoření zygot. Je to zřejmě důsledkem především rudimentární formy bičíků nového kmene.

Fyziologické, biochemické a kultivační charakteristiky:

Jsou téměř shodné s charakteristikami výchozího kmene. V optimálních růstových podmínkách byla produkce biomasy nového kmene prakticky shodná s výchozím kmenem. Schopnost produkovat biomasu i při nižších teplotách i příznivé chemické složení biomasy /54 až 60 % bílkovin v sušině/ zůstalo zřejmě nezměněno.

U nového kmene se z hlediska produkční kultivace významným výhodným znakem existence pouze nepohlavního způsobu rozmnožování. Znamená to, že při vyčerpání živin /zejména zdrojů dusíku nebo fosforu/ z růstového média nehrozí kolaps kultury a dlouhodobé narušení jejího růstu v důsledku hromadného vzniku zygot, které může nastat u kultur původního kmene.

Závěr: Z uvedených charakteristik je patrné, že nový kmen *Chlamydomonas geitleri* ETTL kmen N - FL 1 se shoduje s popisem standardní kultury ve všech znacích významných pro taxonomickou rodovou i druhovou příslušnost, liší se však některými morfologickými znaky /rudimentární forma bičíků, v hustých kulturách těž protáhlý tvar buněk a způsob řazení zoospor uvnitř mateřského obalu/, dále omezeným pohybem rudimentárních bičíků, neschopností normálního pohybu buněk a kromě toho ještě neschopností pohlavního /izogamního/ rozmnožování; rozmnožuje se pouze nepohlavně /zoosporami/, což je u rodu *Chlamydomonas* z hlediska produkční kultivace příznivým, výjimečným, a proto velmi cenným znakem, vzhledem k výhodným růstovým a produkčním vlastnostem tohoto nového kmene.

Biomasy nového kmene může být použito - podobně jako biomasy původního kmene nebo biomasy jiných druhů mikroskopických zelených řas - v potravinářském a krmivářském průmyslu /obohacování výrobků bílkovinami, karoteny, vitaminy i jinými složkami biomasy/, ve farmaceutickém průmyslu /výroba léčiv, biostimulačních látek, živných půd pro růst mikroorganismů/,

v chemickém průmyslu /výroba karotenů, biostimulátorů mikrobiálních procesů, kosmetických přípravků, po příp. též biotransformace složitějších molekul organických látek/, popřípadě ještě k dalším jiným účelům. Kultur nového kmene může být též použito k biologickému dočišťování odpadních vod /snížování obsahu minerálních látek/, k obohacování prostředí kyslíkem /např. v uzavřených ekologických systémech/ apod.

Dále jsou uvedeny:

tabulka 1, vyjadřující tvarový index nového kmene v řidkých a v hustých kulturách,

tabulka 2, ve které je uveden obsah aminokyselin v čisté bílkovině řasy *Chlamydomonas geitleri* ETTL.

Tabulka 1

Tvarový index /délka buňky/šířka buňky/ kmene *Chlamydomonas geitleri* ETTL kmen N - Fl 1 v řidkých a hustých kulturách

	Řídké kultury	Husté kultury
$\bar{x}$	1,160	2,150
s_x	0,115	0,278
$s_{\bar{x}}$	0,006	0,014

$\bar{x}$ = statistický průměr

s_x = standardní deviace

$s_{\bar{x}}$ = střední chyba /odchylka průměru

Tabulka 2

243 977

Obsah aminokyselin v čisté bílkovině řasy *Chlamydomonas geitleri* ETTL

Aminokyselina	Obsah v čisté bílkovině / % /	Aminokyselina	Obsah v čisté bílkovině / % /
lysin	6,79	glycin	6,12
histidin	2,19	alanin	8,02
arginin	10,04	valin	6,22
cystin	0,67	methionin	2,65
kys. asparagová	6,38	isoleucin	4,56
threonin	5,39	leucin	9,11
serin	4,87	tyrosin	3,99
kys. glutamová	12,44	fenylalanin	5,79
prolin	4,77		

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Průmyslový kmen mikroorganismu volvokální řasy *Chlamydomonas geitleri* ETTL A - 794, kmen N - Fl 1, produkující biomasu, schopný růstu za autotrofních podmínek kultivace, rozmnožující se výhradně nepohlavním způsobem.