

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 37 022

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

**C12N 1/12** (2006.01)

**C12N 5/04** (2006.01)

**C12P 7/6409** (2022.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-40374**

(22) Přihlášeno: **20.10.2022**

(47) Zapsáno: **27.04.2023**

(73) Majitel:  
Ústav výzkumu globální změny aV ČR, v.v.i.,  
Brno, Staré Brno, CZ

(72) Původce:  
Ing. Jan Červený, Ph.D., Brno, Chrlice, CZ  
Mgr. Petra Literáková, Karolín, CZ  
Petr Kaštánek, Praha 2, Vinohrady, CZ

(74) Zástupce:  
Kania, Sedlák, Smola, s.r.o., Mendlovo náměstí  
907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

(54) Název užitého vzoru:  
**Kultivační médium pro biotechnologickou  
produkcí mastných kyselin v mořských  
mikrořasách z řádu Thraustochytridů**

## Kultivační médium pro biotechnologickou produkci mastných kyselin v mořských mikrořasách z řádu Thraustochytridů

### 5 Oblast techniky

Technické řešení se týká nového složení živného média pro kultivaci produkční mikrořasy vhodné pro biotechnologie. Produktem zájmu jsou mastné kyseliny vhodné zejména jako doplněk stravy a udržitelná alternativa k živočišné produkci mastných kyselin.

10

### Dosavadní stav techniky

15 Řasy jsou globální primární producenti, kteří představují pozoruhodný zdroj širokého spektra živin. Nutriční složení řas je dobře zdokumentováno a obsahuje především bílkoviny, sacharidy, lipidy a mastné kyseliny, minerály, vitamíny, antioxidanty a stopové prvky. Složky řas jsou přirozeným doplňkem stravy pro člověka a zvířata nahrazující syntetické složky.

20 Řasy se dělí na makrořasy (makroskopické řasy nebo mnohobuněčné velké mořské řasy) a mikrořasy (mikroskopické řasy). Typickým zástupcem mikrořas jsou modrozelené prokaryotické řasy nazývané také sinice a dále eukaryotické mikrořasy, které mají velký potenciál pro produkci potravinářských komodit, jako jsou jedlé oleje, bílkoviny a škrob. Pouze eukaryotické mikrořasy jsou schopny přirozené produkce triglyceridů, na rozdíl od prokaryotických mikrořas.

25 Mikrořasy kombinují vlastnosti typické pro vyšší rostliny a mikrobiální buňky. Mikrořasy jsou schopny velmi rychle reprodukovat svou biomasu v kapalném prostředí, jsou velmi bohaté na oleje a produkují velké množství metabolitů. Produktivita biomasy mikrořas může být 50x vyšší než u nejrychleji rostoucí suchozemské rostliny (trávy). Mikrořasy reprodukují svou biomasu asi 1 až 3x za den a teoreticky mohou produkovat 100x vyšší množství oleje než u suchozemských plodin.

30

Mořské mikrořasy se vyznačují produkcí vysokého množství mastných kyselin. Snadno se pěstují a jsou šetrnější k životnímu prostředí ve smyslu extrakce a rafinace ve srovnání s živočišnými mastnými kyselinami, které jsou spojeny s vůní a přítomností cholesterolu. Zvláštní význam mezi doplňky stravy pak zauímají esenciální mastné kyseliny jako např. omega-3 a omega-6 esenciální 35 mastné kyseliny. Mastné kyseliny jsou začleněny do neutrálních lipidů (triacylglycerolů) jako skladování, ale také do polárních lipidů, jako jsou fosfolipidy a galaktolipidy, které tvoří membránové složky chloroplastu a endoplazmatického retikula. Olejotvorné eukaryotické mikrořasy mohou akumulovat až 50 až 70 % oleje.

40 Mezi významné producenty se řadí mořské mikrořasy z řádu Thraustochytridů. Jednotlivé kmeny Thraustochytridů také produkují významné množství skvalenu a karotenoidů. Tyto mikroorganismy se typicky vyskytují v mangrovníkových oblastech v ústí řek a morfologicky se vyznačují kulovitým tvarem o průměru 10 až 100 μm. Thraustochytridy mohou vytvořit ekologickou a udržitelnou alternativu k rybímu oleji s potenciálem pro komercializaci a mohou 45 růst a hromadit lipidy pomocí levných substrátů, jako je glycerol z bionafty.

Jeden z nejvýkonnějších mikrořasových producentů olejů a mastných kyselin je *Thraustochytrium* sp. AMCQS5-5, který dosahuje vysokých optických hustot okolo 12,3 nebo 10,1 při pěstování s glycerolem nebo glukózou. Nejlepší generační doba pak byla naměřena 30 hodin a bylo dosaženo 50 62 hmotnostních procent celkových lipidů při 47% zastoupení mastných kyselin.

Cílem technického řešení je představit nový kmen mikrořasy *Schizochytrium* z řádu Thraustochytridů s téměř dvojnásobnou koncentrací mastných kyselin naakumulovaných v suspenzi za stejnou dobu oproti původnímu kmeni této mikrořasy

55

Podstata technického řešení

- 5 Výše uvedené nedostatky odstraňuje kultivační médium pro biotechnologickou produkci mastných kyselin v mořských mikrořasách z řádu Thraustochytridů podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že

má následující složení

Název chemické složky	Koncentrační rozsah, kg/m <sup>3</sup>
Glycerol	23,75 – 26,25
Kvasničný extrakt	3,42 – 3,78
Mořská sůl	17,10 – 18,90
CaCl <sub>2</sub>	$9,50 \cdot 10^{-2}$ – $10,50 \cdot 10^{-2}$
MnCl <sub>2</sub>	$9,88 \cdot 10^{-3}$ – $10,92 \cdot 10^{-3}$
ZnSO <sub>4</sub>	$9,88 \cdot 10^{-3}$ – $10,92 \cdot 10^{-3}$
CuSO <sub>4</sub>	$1,52 \cdot 10^{-3}$ – $1,68 \cdot 10^{-3}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	$3,00 \cdot 10^{-5}$ – $3,40 \cdot 10^{-5}$
NiSO <sub>4</sub>	$1,52 \cdot 10^{-3}$ – $1,68 \cdot 10^{-3}$
FeSO <sub>4</sub>	$1,90 \cdot 10^{-5}$ – $2,10 \cdot 10^{-5}$
CoCl <sub>2</sub>	$1,25 \cdot 10^{-4}$ – $1,39 \cdot 10^{-4}$
Vitamín B <sub>1</sub>	$14,44 \cdot 10^{-4}$ – $15,96 \cdot 10^{-4}$
Vitamín B <sub>5</sub>	$4,86 \cdot 10^{-2}$ – $5,38 \cdot 10^{-2}$
Vitamín B <sub>12</sub>	$2,28 \cdot 10^{-3}$ – $2,52 \cdot 10^{-3}$
HCl $3,646 \cdot 10^{-3}$ kg/mol	$8,00 \cdot 10^{-4}$ – $12,00 \cdot 10^{-4}$

10

Objasnění výkresů

- 15 Obr. 1 představuje foto fluorescenční mikroskopické analýzy původního (A) a nového kmene (B) ukazující zvýšenou produktivitu lipidových tělísek.

Příklad uskutečnění technického řešení

20

Produkcí a ověřovací experimenty mikrořasy *Schizochytrium* byly realizovány v laboratorních kultivátorech MC-1000 (Photon Systems Instruments, Brno, ČR), které umožňují souběžnou kultivaci v osmi zkumavkách o objemu 80 ml/zkumavku. Kultivátor umožňuje přesnou regulaci teploty v celém objemu zkumavek v rozmezí teplot od cca 15 °C do 50 °C. Distribuce živin a plynů je zajištěna systémem probublávání buněčnou suspenzí.

25

Kultivace byla prováděna při teplotě 28 °C, bublání vzduchem 1 v/v, v optimalizovaném složení živného média s kyselostí vhodnou pro biotechnologické aplikace, tj. pH 4,5, které působí antisepticky.

30

Tabulka 1 - Složení optimalizovaného kultivačního média s pH 4,5

Název chemické složky	Koncentrační rozsah, mg/l
Glycerol	23 750 – 26 250
Kvasničný extrakt	3 420 – 3 780
Mořská sůl (BioSal)	17 100 – 18 900
CaCl <sub>2</sub>	95 - 105
MnCl <sub>2</sub>	9,88 - 10,92
ZnSO <sub>4</sub>	9,88 - 10,92
CuSO <sub>4</sub>	1,52 - 1,68
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,03 - 0,034
NiSO <sub>4</sub>	1,52 - 1,68
FeSO <sub>4</sub>	0,019 - 0,021
CoCl <sub>2</sub>	0,125 - 0,139
Vitamín B <sub>1</sub>	1,444 - 1,596
Vitamín B <sub>5</sub>	48,6 - 53,8
Vitamín B <sub>12</sub>	2,28 - 2,52
HCl 0,1 M	0,8 – 1,2

5

Porovnání kapacity pro produkci mastných kyselin bylo provedeno ve třech biologických replikátech. Výsledná produktivita nového kmene byla 53 % olejů v porovnání s 32 % olejů původního kmene a obsah mastných kyselin se zvýšil na 85 % mastných kyselin u nového kmene z 76 % mastných kyselin u původního kmene (hmotnostní procenta, tj. hmotnost mastných kyselin na hmotnost suché biomasy).

10

Náklady na výrobu optimalizovaného živného/kultivačního média byly sníženy na 5 % původních nákladů oproti složení s běžně používanými Cheng solemi.

15

Zvýšená produktivita byla potvrzena fluorescenční mikroskopickou analýzou s využitím barvení intracelulárních lipidových tělísek pomocí lipofilního barviva BODIPY 505/515 (4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), které selektivně barví lipidy včetně mastných kyselin, cholesterylesterů, fosfolipidů, sfingolipidů a jejich analogů.

20

Pro zajištění udržitelného využití kmene v průmyslových produkčních podmínkách byl dále vyvinut kryoprezervační protokol pro dlouhodobé hlubokomrazé skladování kmene a dobrou reprodukovatelnost počátečních podmínek kultivace.

25

Na obr. 1 jsou znázorněny buňky z populace sbírkového kmene vykazující standardní akumulaci lipidových tělísek (levý panel A) v porovnání s hyper-produkující novou linií mikrořasy, kdy je zřetelná zvýšená produkce lipidových tělísek pozorovatelná na obrázku jako zvýšená granularita vnitřní struktury buněk (pravý panel B) a obecně zvýšená distribuce velkých buněk plných lipidových tělísek.

30

S využitím vlastní vyvinuté technologie pro akcelerovanou evoluci mikrořas byl získán nový kmen mikrořasy *Schizochytrium* z řádu Thraustochytridů s téměř dvojnásobnou koncentrací mastných kyselin naakumulovaných v suspenzi za stejnou dobu oproti původnímu kmeni této mikrořasy. Kultura byla pěstována za optimálních podmínek pro produkci biomasy tak, aby po cca. 24 hodinách intenzivního růstu došlo k akceleraci syntézy lipidů a poté došlo k selekci / výběru jedinců s vysokým obsahem lipidů a mastných kyselin. Následná akcelerovaná evoluce vedla k získání stabilního produkčního kmene, který vykazuje více jak dvojnásobnou produkci mastných

35

kyselin oproti původnímu sbírkovému kmeni mikrořasy *Schizochytrium*. Dále tento kmen vykazoval významně zlepšené generační časy okolo 1,5 hodin.

5 Průmyslová využitelnost

Složení kultivačního média s představeným optimálním nutričním složením pro kultivaci mikrořas z řádu Thraustochytridů, vyvinuté pro kmen *Schizochytrium*.

10 Kultivační podmínky zajišťují zvýšenou produktivitu biomasy a mastných kyselin mikrořasou *Schizochytrium*.

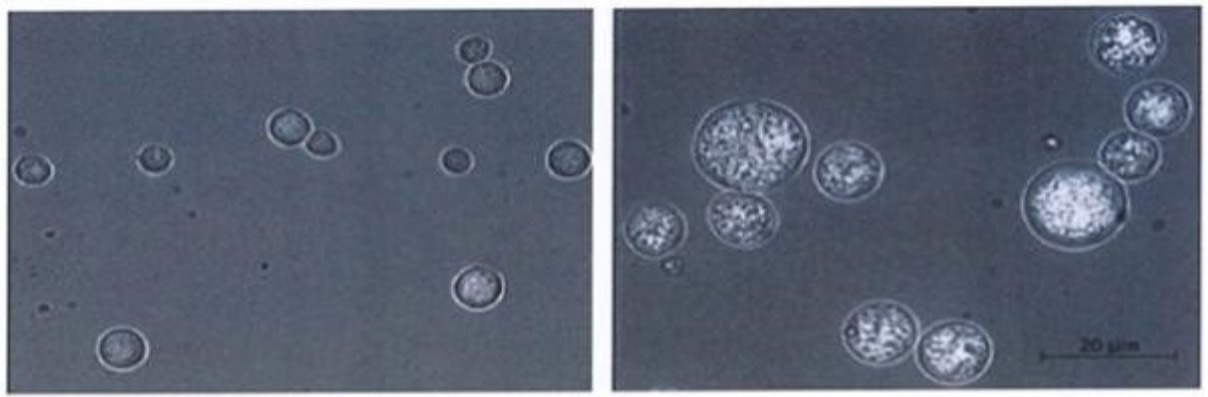
## NÁROKY NA OCHRANU

1. Kultivační médium pro biotechnologickou produkci mastných kyselin v mořských mikrořasách z řádu Thraustochytridů, **vyznačující se tím**, že má následující složení

Název chemické složky	Koncentrační rozsah, kg/m <sup>3</sup>
Glycerol	23,75 – 26,25
Kvasničný extrakt	3,42 – 3,78
Mořská sůl	17,10 – 18,90
CaCl <sub>2</sub>	$9,50 \cdot 10^{-2}$ – $10,50 \cdot 10^{-2}$
MnCl <sub>2</sub>	$9,88 \cdot 10^{-3}$ – $10,92 \cdot 10^{-3}$
ZnSO <sub>4</sub>	$9,88 \cdot 10^{-3}$ – $10,92 \cdot 10^{-3}$
CuSO <sub>4</sub>	$1,52 \cdot 10^{-3}$ – $1,68 \cdot 10^{-3}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	$3,00 \cdot 10^{-5}$ – $3,40 \cdot 10^{-5}$
NiSO <sub>4</sub>	$1,52 \cdot 10^{-3}$ – $1,68 \cdot 10^{-3}$
FeSO <sub>4</sub>	$1,90 \cdot 10^{-5}$ – $2,10 \cdot 10^{-5}$
CoCl <sub>2</sub>	$1,25 \cdot 10^{-4}$ – $1,39 \cdot 10^{-4}$
Vitamín B <sub>1</sub>	$14,44 \cdot 10^{-4}$ – $15,96 \cdot 10^{-4}$
Vitamín B <sub>5</sub>	$4,86 \cdot 10^{-2}$ – $5,38 \cdot 10^{-2}$
Vitamín B <sub>12</sub>	$2,28 \cdot 10^{-3}$ – $2,52 \cdot 10^{-3}$
HCl $3,646 \cdot 10^{-3}$ kg/mol	$8,00 \cdot 10^{-4}$ – $12,00 \cdot 10^{-4}$

5

1 výkres



(A)

Obr. 1

(B)