

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 303 645

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*C12N 1/12* (2006.01)

*C12P 7/64* (2006.01)

*C12P 9/00* (2006.01)

*C12R 1/89* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **2011-705**  
(22) Přihlášeno: **07.11.2011**  
(40) Zveřejněno: **23.01.2013**  
(**Věstník č. 4/2013**)  
(47) Uděleno: **17.12.2012**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **23.01.2013**  
(**Věstník č. 4/2013**)

(56) Relevantní dokumenty:

Morris GJ et al. The cryopreservation of *Chlamydomonas*. *Cryobiology*, 1979, 16, 401-410.; Mosser JL et al. Photosynthesis in the snow. The alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 1977, 13, 22-27.; Janero DR, Barnett R. Cellular and thylakoid-membrane phospholipids of *Chlamydomonas reinhardtii* 137+. *Journal of Lipid Research*, 1981, 22, 1126-1130.; Sugimoto K et al. Upregulation of PG synthesis on sulfur-starvation for PS I in *Chlamydomonas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 369, 660-665.; Bidigare RR, Ondrusek ME. Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *Journal of Phycology*, 1993, 29, 427-434..

(73) Majitel patentu:

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České  
Budějovice, CZ  
Univerzita Karlova v Praze, Praha 1, CZ

(72) Původce:

Kaftan David Mgr. Ph.D., Nové Hrady, CZ  
Lukeš Martin Mgr., České Budějovice, CZ  
Nedbalová Linda RNDr. Ph.D., Praha 6, CZ

(74) Zástupce:

PatentCentrum Sedlák a Partners s.r.o., Ing. Jiří Sedlák,  
Husova 5, České Budějovice, 37001

(54) Název vynálezu:

**Produkční kmen řasy *Chlamydomonas cf. nivalis* pro výrobu fosfatidylglycerolu (PG), způsob zvýšení obsahu PG v tomto produkčním kmene, a použití tohoto produkčního kmene pro průmyslovou výrobu PG**

(57) Anotace:

Produkční kmen zelené řasy *Chlamydomonas cf. nivalis*, uložený ve Sběrce autotrofních organismů Botanického ústavu AVČR, Třeboň, Dukelská 135, pod deponitním číslem vzorku CCALA 970: *Chlamydomonas cf. nivalis* NEDBALOVA, 2011/1, který je využitelný jako zdroj pro průmyslovou výrobu snadno extrahovatelného čistého fosfatidylglycerolu (PG) pro chemické standardy, farmaceutické aplikace a další použití. Řešení popisuje také způsob zvýšení obsahu PG a polynenasycených mastných kyselin v produkčním kmene, spočívající v jeho vystavení vysokým nebo nízkým teplotám, případně střídání vysokých a nízkých teplot.

CZ 303645 B6

**Produkční kmen řasy *Chlamydomonas cf. nivalis* pro výrobu fosfatidylglycerolu (PG), způsob zvýšení obsahu PG v tomto produkčním kmeni, a použití tohoto produkčního kmene pro průmyslovou výrobu PG**

5

Oblast techniky

Vynález se týká nového produkčního kmene řasy *Chlamydomonas cf. nivalis*, vhodného pro průmyslovou výrobu fosfatidylglycerolu (PG), a rovněž způsobu zvýšení obsahu PG v tomto produkčním kmeni.

10

Dosavadní stav techniky

Fosfolipidy patří do třídy lipidů s polární fosfátovou skupinou na třetí pozici glycerolové kostry, na kterou se esterovou vazbou na první a druhé pozici připojují mastné kyseliny svou acylovou skupinou. Ve vodném prostředí spontánně vytvářejí lipidovou dvouvrstvu, která je základem všech biologických membrán. Nejvýznamnějšími zástupci glycerofosfolipidů jsou fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol, fosfatidylserin a fosfatidylglycerol (PG). Všechny fosfolipidy jsou ve vodném prostředí kladně nabitě a hrají tak v buňkách nezastupitelnou úlohu.

15

20

V buňkách fotosyntetických organizmů, jako jsou sinice, řasy a vyšší rostliny se vyskytuje PG ve zvýšeném množství v thylakoidních membránách, kde tvoří až 15 % všech thylakoidních lipidů, kterým dominují galaktolipidy monogalaktosyldiacylglycerol (MGDG) a digalaktosyldiacylglycerol (DGDG), následované sulfolipidem sulfochinovosyldiacylglycerol (SQDG) (Morgan–Kiss et al. 2006). Klíčová role PG v thylakoidních membránách (Sato 2004; Loll et al. 2007) spočívá především v podílu na procesech správného složení membránových proteinových podjednotek fotosystému II (PSII), je hlavním strukturálním komponentem při protein–lipidových interakcích (Szalontai et al. 2003; Domonkos et al. 2008; Guskov et al. 2009), jako lipid nesoucí náboj se hlavní měrou podílí na kontrole povrchového náboje membrány (Apostolova et al. 2008) a především strukturálně stabilizuje fotosystém I (PSI) (Rawlyer and Siegenthaler 1981; Yang et al. 2005), PSII a světlosběrné antény (LHCII) (El Maanni et al. 1998; Dubertret et al. 2002) a ovlivňuje rychlost elektronového transportu v PSI a PSII. V zelené řase *Chlamydomonas reinhardtii* se účastní procesu skládání PSII (Pineau et al. 2004) a ovlivňuje aktivitu PSII (Sato et al. 2000). Podobně je tomu tak i v *Synechocystis* sp. PCC6803 (Laczko–Dobos et al. 2008), kde navíc stabilizuje vazebné místo pro chinon QB binding v PSII (Gombos et al. 2002) a zvláště pak hraje důležitou roli na luminální straně thylakoidní membrány chloroplastů špenátu (Duchene et al. 2000) a při vývoji thylakoidní membrány v *Arabidopsis thaliana* (Hagio et al. 2002).

25

30

35

40

V buňkách nefotosyntetických bakterií a v mitochondriích představuje PG dominantní složku jejich vnitřních membrán jako prekurzor kardiolipinu (1,3–bis(sn–3′–fosfatidyl)–sn–glycerol). Ve zvířecích tkáních dosahuje podíl fosfolipidů maximálně 10 % celkového obsahu lipidů s výjimkou bohaté přítomnosti v plicích povrchově aktivních látkách. Zde hraje PG ve fyziologii obratlovců nezastupitelnou roli jako esenciální konstituent plicní povrchově aktivní látky, tvořené komplexní směsí povrchově aktivních fosfolipidů (podíl PG je až 11%) a bílkovin, které zachovávají funkčnost plic udržováním zvýšeného povrchového napětí (Cernansky et al. 1980). Nedávno bylo prokázáno, že PG potlačuje účinek patogenu produkovaného *Mycoplasma pneumoniae*, snižuje prozánětlivou reakci (Kandasamy et al. 2011) a zabraňuje infekci a zánětu dýchacího ústrojí způsobené synciciálním pneumovirem (Numata et al. 2010). Čistý PG se úspěšně používá při léčbě akutních zranění plic a akutního syndromu dýchacích obtíží, viz (Raghavendran et al. 2008) kde je PG součástí složení syntetické povrchově aktivní látky Pumactant (Britannia Pharmaceuticals Limited, UK), Venticute (Altana Pharma AG, D) a KL–4 (Discovery Laboratories, Inc., USA). Tyto směsi povrchově aktivních látek se vyznačují celou řadou výhod oproti produktům extrahovaným z živočišných tkání. Kromě lepší výrobní ekono-

45

50

55

miky a chemické čistoty navíc neobsahují povrchově aktivní bílkoviny, které ačkoliv zvyšují účinek preparátu, mohou vyvolávat antigenní reakci a prospěšný účinek je tak sporný.

5 PG se společně s ostatními fosfolipidy (lecitiny) již celá desetiletí hojně používá v potravinářském průmyslu, kde nachází uplatnění jako antioxidant a emulgátor. Lecitin(y) se využívají především při výrobě cukrovinek (čokolád, polev, žvýkaček), instantních pokrmů, náhražek mléčných výrobků a pečiva. V kosmetickém, farmaceutickém a chemickém průmyslu jsou využívány při výrobě emulzí, barev, vosků a dalších.

10 Současná světová produkce fosfolipidů se počítá na stovky tisíc tun ročně. Nejčastějšími zdroji čistého PG jsou vaječný žloutek, sója a buněčné extrakty *Escherichia coli* (640, 1840 a 6300 USD na 1 gram prášku, Avanti Polar Lipids, Inc.). Cena čistého PG roste se zvyšující se délkou řetězců mastných kyselin (1,2 dioleoyl – glycero–3–fosfoglycerol je třikrát dražší než 1,2 dipalmitoyl – glycero–3–fosfoglycerol). Daleko nejcennějšími jsou však lipidy s vysokými procenty řetězců polynasaturovaných mastných kyselin a především takzvaných omega 3 mastných kyselin.

20 Úkolem vynálezu je najít vhodný organismus, v jehož thylakoidní membráně by se tvořil přírodní PG v co nejvyšší kvalitě a v co nejvyšším množství, a dále vyřešit zvýšení obsahu PG v thylakoidních membránách tohoto organismu.

#### Podstata vynálezu

25 Tento úkol řeší zelená řasa *Chlamydomonas cf. nivalis*, která ve smyslu tohoto vynálezu představuje produkční fotosyntetický mikroorganismus pro získávání PG. Produkční kmen řasy *Chlamydomonas cf. nivalis* pro výrobu fosfatidylglycerolu (PG) je uložený ve Sbírce autotrofních organismů Botanického ústavu AVČR, Třeboň, Dukelská 135, pod depozitním číslem vzorku CCALA 970: *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1. Vynález se dále zabývá způsobem zvýšení obsahu PG v průmyslovém produkčním kmeni této řasy.

35 Thylakoidní membrány chloroplastů zelené řasy *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1, jejíž typickou lokalitou jsou tající sněhová pole vrcholových plání Krkonoš a Vysokých Tater obsahují víc než 80 % molárních PG. Buňky řasy vykazují maximální růstovou rychlost v širokém rozmezí teplot od 10 po 25 °C. Při 5 °C růstová rychlost klesá na polovinu svého maxima a při dalším zchlazování pokračuje ve zpomalování až k teplotě 2 °C, kdy řasa stále ještě vykazuje pozitivní růst (10 % maxima). Řasa také toleruje maximální dávky slunečního záření a přežívá opakované cykly zmrazení a rozmrazení bez jakýchkoliv příznaků poškození buněk. Tato schopnost produkovat biomasu při široké toleranci k výkyvům teplot a světelného záření zvyšuje potenciální využití řasy *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 jako zdroje biologicky aktivních sloučenin, konkrétně lipidů v biotechnologických aplikacích, především takových, které vyžadují sníženou teplotu kultivačního procesu. Tento vynález se zaměřuje na využití jedinečného složení membrán druhu *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 obsahující téměř výhradně PG a způsob zvýšení obsahu PG pro extrakci z těchto membrán za účelem vytvoření vhodného systému pro masovou výrobu snadno extrahovatelného čistého PG pro chemické standardy a farmaceutické aplikace. Také je výhodné, že lipidy obsažené v těchto thylakoidech zelené řasy *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 obsahují 15 až 55 % molárních kyseliny olejové, 5 až 35 % molárních kyseliny  $\alpha$ -linolenové a 10 % molárních kyseliny palmítové.

50 Předmětem vynálezu je také způsob zvýšení obsahu PG, kyseliny olejové a kyseliny  $\alpha$ -linolenové v produkčním fotosyntetickém mikroorganismu, kdy fotosyntetický mikroorganismus se vystaví vysokým teplotám v rozmezí 27 až 32 °C nebo nízkým teplotám v rozmezí 0 až 5 °C. Mikroorganismus při nízkých teplotách roste pomaleji, jeho růst je ale stabilní a vytrvalý. Při působení vysokých teplot mikroorganismus vykazuje prudký růst, což znamená i vysoký zisk PG.

Je výhodné, když se produkční kmen řady vystaví střídání vysokých a nízkých teplot, což umožňuje kombinovat všechny potřebné růstové faktory.

Výhody vynálezu spočívají v možnosti získání vysoce kvalitního přírodního PG z thylakoidních membrán mikroorganismu popsaného v této přihlášce vynálezu a ve způsobu zvýšení obsahu PG v thylakoidních membránách tohoto organismu, vedoucím k vyšší výtěžnosti PG.

#### Přehled obrázků na výkresech

Vynález bude blíže osvětlen pomocí výkresů, na nichž znázorňují:

Obrázek 1. Teplotní závislost růstové rychlosti *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 (prázdná kolečka) a *Chlamydomonas reinhardtii* (plná kolečka) vyjádřená jako doba zdvojení řasové populace. Hodnoty představují průměr tří nezávislých měření.

Obrázek 2. Změny složení lipidů u *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 po 72 hodinách aklimace na teplotu od 5 do 35 °C. Hodnoty představují průměr tří nezávislých měření.

Obrázek 3. Změny složení lipidů u *Chlamydomonas reinhardtii* po 72 hodinách aklimace na teplotu od 5 do 35 °C. Hodnoty představují průměr tří nezávislých měření.

Obrázek 4 Změny složení mastných kyselin u *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 po 72 hodinách aklimace na teplotu od 5 do 35 °C. Hodnoty představují průměr tří nezávislých měření.

Obrázek 5. Změny složení mastných kyselin u *Chlamydomonas reinhardtii* po 72 hodinách aklimace na teplotu od 5 do 35 °C. Hodnoty představují průměr tří nezávislých měření.

Obrázek 6. Závislost rychlosti (horní panel) a relativní amplitudy elektronového transportu mezi chinony Q<sub>A</sub> a Q<sub>B</sub> v PSII (dolní panel) na teplotě v *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 (prázdná kolečka) a *Chlamydomonas reinhardtii* (plná kolečka). Body představují hodnoty naměřené při nejméně osmi nezávislých měřeních.

Obrázek 7. Závislost kritické teploty T<sub>c</sub> (horní panel) a maximální teploty T<sub>m</sub> (spodní panel) na aklimační teplotě u *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 (prázdná kolečka) a *Chlamydomonas reinhardtii* (plná kolečka). Hodnoty představují průměr tří nezávislých měření.

Obrázek 8. Rychlost vývoje kyslíku u *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 kultivované při 5 °C (prázdná kolečka) a *Chlamydomonas reinhardtii* kultivované při 24 °C (plná kolečka) a měřené od 2 do 35 °C. Hodnoty představují průměr pěti nezávislých měření.

#### Příklady uskutečnění vynálezu

Tento vynález představuje nový fotosyntetický mikroorganismus a metodu pro jeho buněčný růst pro následné zpracování buněk a izolování čistých lipidů z tohoto mikroorganismu. Konkrétně, tento nový vynález je možné použít jako prostředek k tomu, aby fotosyntetický mikroorganismus zvýšil molární poměr PG a polynenasycených mastných kyselin ve svých thylakoidních membránách za účelem dosažení vyššího zisku čistého PG požadovaného obsahu polynenasycených mastných kyselin.

Principy a funkce tohoto vynálezu je možné lépe pochopit s odkazem na výkresy a přiložené popisy.

Před podrobným uvedením minimálně jednoho příkladu uskutečnění vynálezu je nutné zdůraznit, že vynález není omezen ve své aplikaci na detaily uvedené v následujícím popisu nebo na příkladné postupy v jednotlivých příkladech. Vynález má i další příklady uskutečnění nebo je mož-

né jej realizovat nebo provést jinými různými způsoby. Je také nutné zdůraznit, že frazeologie a terminologie je zde použita pro účely popisu a nesmí být považována za omezující.

5 Příklad uskutečnění vynálezu zahrnuje podmínky, za kterých jsou thylakoidní membrány psychotolerantní zelené řasy složeny z více než 80 % z PG. Také při manipulaci s růstovými podmínkami, především s růstovou teplotou, mohou lipidy obsažené v thylakoidech obsahovat od 15 do 55 % molárních kyseliny olejové (18 : 1) a od 5 do 35 % molárních  $\alpha$ -linolenové kyseliny (18 : 3) s konstantním obsahem 10 % kyseliny palmitové (16 : 0).

10 Příklad uskutečnění vynálezu zahrnuje i způsob, kterým je možné zvýšit obsah PG v thylakoidních membránách zelené řasy a snížit tak množství kontaminujících lipidů a následně dosáhnout při buněčné extrakci vyššího zisku čistého PG s požadovaným obsahem mastných kyselin.

15 Výraz „fotosyntetický mikroorganismus“ uvedený v tomto vynálezu označuje mikroorganismus (eukaryotický), který je schopen konvertovat světelnou energii a uhlíkový zdroj (např. oxid uhličitý) na trióza-fosfáty.

20 Fotosyntetický mikroorganismus dle předloženého vynálezu může být psychotolerantní. Výraz „psychotolerantní mikroorganismus“ uvedený v tomto vynálezu označuje mikroorganismus s fyziologickou růstovou teplotou v rozsahu od cca 0 do 20 °C.

Fotosyntetický mikroorganismus tohoto aspektu u tohoto vynálezu může být psychofilní. Výraz „psychofilní mikroorganismus“ uvedený v tomto vynálezu označuje mikroorganismus s fyziologickou růstovou teplotou v rozsahu od cca -15 do 10 °C.

25 Fotosyntetický mikroorganismus tohoto aspektu u tohoto vynálezu může být mezofilní. Výraz „mezofilní mikroorganismus“ uvedený v tomto vynálezu označuje mikroorganismus s fyziologickou růstovou teplotou v rozsahu od cca 25 do 40 °C.

30 Fotosyntetický mikroorganismus obecně označuje bakterii (aerobní a anaerobní) a řasu (eukaryotickou).

35 Výraz „biomasa“ uvedený v tomto vynálezu označuje objem nebo množství tkáně (především tkáně s obsahem celulózy) produkované fotosyntetickým mikroorganismem v růstovém období, které by mohlo také určovat nebo ovlivňovat zisk fotosyntetického organismu nebo zisk na plochu růstu.

40 Výraz „zisk“ uvedený v tomto vynálezu označuje objem nebo množství chemické látky produkované a získané jako produkt vyprodukovaný fotosyntetickým mikroorganismem. Tedy, zvýšený zisk by mohl ovlivnit ekonomický přínos dosažitelný z fotosyntetického organismu během určité růstové doby.

45 Výraz „zlepšení“ nebo „zvýšení“ uvedený v tomto vynálezu označuje zlepšení nebo zvýšení zisku/účinnosti extrakce PG z fotosyntetických mikroorganismů podle tohoto vynálezu než je tomu u běžného nativního fotosyntetického mikroorganismu.

50 Další cíle, výhody a nové vlastnosti tohoto vynálezu budou zřejmé osobě znalé stavu techniky po prozkoumání následujících příkladů, které není možné označovat za vyčerpávající. Dále, každé z jednotlivých řešení a aspektů tohoto vynálezu uvedené výše v tomto dokumentu a nárokované v patentových nárocích níže vyhledává experimentální podporu v následujících příkladech. Uváděné hodnoty a postupy jsou uváděné pro řasu *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1, která představuje nový průmyslový produkční fotosyntetický mikroorganismus podle tohoto vynálezu, a řasu *Chlamydomonas reinhardtii* pro porovnání běžného produkčního fotosyntetického mikroorganismu.

55

## Obecné materiály a experimentální postupy

## Organismy a podmínky růstu

5 Kultury *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 a *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (tato kultura je uváděna pro porovnání) byly pěstovány v kapalném růstovém mediu BBM (2,94mM NaNO<sub>3</sub>, 0,30mM MgSO<sub>4</sub>, 0,42mM NaCl, 0,33mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,28mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,17mM CaCl<sub>2</sub>, 30,68μM ZnSO<sub>4</sub>, 7,27μM MnCl<sub>2</sub>, 4,93μM MoO<sub>3</sub>, 6,29μM CuSO<sub>4</sub>, 1,68μM Co(NO<sub>3</sub>), 0,18mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,17mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 0,552mM KOH, 17,92μM FeSO<sub>4</sub> a 18,71μM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), při teplotách 2,5 až 24 °C v 2 l kultivačních lahvích míchaných proudem vzduchu (1 litr za minutu) za periodického osvětlení (16 h světla, 8 h tmy) fluorescenčním světlem (Flora, Osram) poskytujícím 100 μmol fotonů m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Buňky, které dosáhly pozdní exponenciální fáze byly zředěny na 1 μg Chl mL<sup>-1</sup> a převedeny do sub- a supra-optimálních teplot 5, 10, 15, 20, 25, 30 a 35 °C na dobu 72 hodin.

15 Pěstování řasové kultury ve větším objemu bylo realizováno vsádkou 2 L suspenze o koncentraci chlorofylu 10 μg.mL<sup>-1</sup> do řasového fotobioreaktoru o objemu 20 L umístěného v místnosti chlazené na 5 °C. Osvětlování suspenze bylo zvenčí zajištěno fluorescentním světlem (Flora, Osram) poskytujícím 100 μmol fotonů m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> a zevnitř ponořenými voděodolnými pásy LED červené a modré barvy ( $\lambda_{\text{červená}} = 635 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{modrá}} = 465 \text{ nm}$ ) poskytující světelné intenzity 200 μmol fotonů m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

25 Růst řasové kultury byl monitorován měřením přírůstku koncentrace chlorofylu v buňkách. Deset mL kultury buněk bylo extrahováno do 100% dimethylsulfoxidu, absorpční spektra byla měřena ve spektrometru ShimadzuUV-2401PC každých 24 hodin. Koncentrace chlorofylu a byla počítána podle metody Lichtentalera a Welburna pomocí rovnic:

$$\text{Chlorofyl a} = 12.19.A665.1 - 3.45.A649.1 \text{ [}\mu\text{g.mL}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Chlorofyl b} = 21.99.A649.1 - 5.32.A665.1 \text{ [}\mu\text{g.mL}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Celkové karotenoidy} = (1000.A480) - (2.14.\text{Chl a}) - (70.16.\text{Chl b})/220 \text{ [}\mu\text{g.mL}^{-1}\text{]}.$$

30 Rychlost růstu byla určena podle sklonu lineární regrese přirozeného logaritmu koncentrace chlorofylu v závislosti na čase.

## Izolace thylakoidních membrán

35 Thylakoidní membrány byly izolovány metodou podle Chua a Bennouna (Chua et al. 1975) s drobnými modifikacemi. Buňky byly sklizeny centrifugací (2500 g, 15 min) a dvakrát propláchnuty v pufru obsahujícím 0,3M sacharózu, 25mM HEPES-KOH pH 7,5 a 1mM MgCl<sub>2</sub>. Buňky byly rozdrčeny ve french presu při tlaku 4000 Psi, centrifugovány (2000 g, 10 min) a pelet resuspendován v 3M sacharóze, 5mM HEPES-KOH pH 7,5, 1mM EDTA (pufr B) a centrifugován (50000 g, 10 min). Pelet byl resuspendován v celkovém objemu 10 mL v pufru B s 1,8M sacharózou. Pět mL pufru B s 2M sacharózou bylo převrstveno 5 mL vzorku v pufru B s 1,8M sacharózou. a 2 mL pufru B s 1,3M sacharózou, 5 mL pufru B s 0,5M sacharózou a centrifugováno v ultracentrifuze Beckman Coulter Optima TM L-90K (140000 g, 1 hodina). Thylakoidní membrány byly vybrány mezi vrstvou obsahující 1,8 a 1,3M sacharózou. Membrány byly promyty třemi objemy 5mM HEPES-KOH pH 7,5, 10mM EDTA a centrifugovány (50000 g, 45 min).

## Extrakce lipidů

50 Jeden mL izolovaných thylakoidů byl centrifugován při 50 000 g po dobu 25 min. Pelet byl resuspendován v 2 mL isopropanolu, homogenizován třepáním a ponechán odstát po dobu 10 min. Poté bylo přidáno 0,5 mL vody extrahované chloroformem a po protřepání bylo přidáno 3 ml hexanu a roztok byl znovu promíchán třepáním a ponechán odstát další 2 min. Po přidání

2,5 mL Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 10 H<sub>2</sub>O (3,3 g v 10 mL), byl roztok protřepán a centrifugován při 2000 g po 10 min. Horní hexanová fáze byla převedena do evaporační baňky, do extrahovaného roztoku byl přidán 1 mL hexanu a po protřepání byl centrifugován při 2000 g po 10 min a horní hexanová fáze byla znovu odebrána do evaporační baňky. Poslední propláchnutí bylo provedeno s 2 ml isopropanolu : směsí hexanu (2 : 7, v/v) s následným protřepáním a centrifugací. Sebrané hexanové fáze byly sdruženy a odpařeny v rotačním evaporátoru nebo v proudu dusíku a uskladněny v -80 °C.

Případně byla použita upravená metoda podle Wady a Muraty pro extrakci lipidů. Jeden mL vzorku byl protřepán v teflonové centrifugační zkumavce se šroubovacím uzávěrem s 3,75 mL CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH (1 : 2, v/v). Směs byla ponechána odstát po dobu 20 min při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 1,25 ml CHCl<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>O a vzniklý roztok byl protřepán a následně centrifugován při 2500 g po dobu 15 min. Poté byla opatrně odebrána čirá horní fáze spolu s kalnou vrstvou pod ní bylo přidáno 2,5 ml CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O (10:9, v/v). Roztok byl protřepán a centrifugován při 2500 g 15 min při pokojové teplotě a spodní fáze byla odebrána a převedena do čisté evaporační baňky. Vzorek byl odpařen buď v rotačním evaporátoru nebo v proudu dusíku. Usušený vzorek byl rozpuštěn v CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH (2 : 1, v/v) a uskladněn při -80 °C. Aby nedošlo k oxidaci při dlouhodobém uskladnění, byl přidán BHT v konečné koncentraci 0,05%.

#### 20 Analýza lipidů a mastných kyselin

Extrakty lipidů byly nanесeny ve formě 2,5 cm širokých pruhů 1,5 cm ode dna na TLC desky (250 μm TLC, MERCK). Směsi pro rozdělení lipidů byly buď CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH : kyselina octová : voda (80 : 9 : 12 : 2, v/v) nebo CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH : NH<sub>4</sub>OH (28%) (13 : 7 : 1, v/v). Separace byla provedena do výšky 19 cm ode dna. TLC desky byly postříkány roztokem primulinu (0,01%, w/w v acetonu : voda 60 : 40, v/v) a zviditelněny pod UV světlem (365 nm). Jednotlivé třídy lipidů byly identifikovány podle známých standardů MGDG, DGDG, SQDG a PG (Larodan, Malmo, Švédsko).

Pásky obsahující třídy lipidů byly seškrabány a přeneseny do teflonových centrifugačních zkumavek se šroubovacím uzávěrem. 50 μg kyseliny pentadekanové bylo přidáno do každé zkumavky jako vnitřní standard společně s 0,5 mL hexanu a 1 mL BF<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH (10% w/w). Zkumavka byla propláchnuta dusíkem a umístěna po dobu 1 hodiny do teploty 85 °C. Po ochlazení na pokojovou teplotu bylo přidáno 0,5 mL vody extrahované chloroformem a roztok byl protřepán. Byly přidány 2 mL hexanu, roztok byl znovu protřepán a byla provedena centrifugace při 2500 g po 5 min. Horní hexanová vrstva byla odebrána do čisté zkumavky k odpaření. Zbývající směs byla dvakrát promyta se 2 mL hexanu, jak bylo popsáno výše. Sebrané vrstvy hexanu byly jímány a koncentrovány proudem dusíku k dosažení konečného objemu 20 μL.

Kvalitativní analýza mastných kyselin byla provedena pomocí GC-FID buď pomocí Hewlett Packard HP6890 Series na koloně sp2330 (30 m x 0,25 mm, df 0,20 μm, Supelco) nebo pomocí Carlo Erba HRGC 5300 megaserie na koloně Omegawax 320 (30 m x 0,32 mm, df 0,25 μm, Supelco). Jako plynový nosič byl použit vodík o tlaku 70 kPa. Program nastavení teploty byl následující: počáteční teplota kolony byla 140 °C. Teplota byla zvyšována rychlostí 4,5 °C za min až po dosažení teploty 240 °C. Tato teplota byla držena po dalších 10 min. Teplota vstřikovače byla 250 °C a teplota FID byla 260 °C. Retenční časy FAME byly porovnány se známými standardy Supelco<sup>®</sup> 37 Component FAME Mix a PUFA č. 3 Supelco (z menhadenového oleje).

#### Měření rychlosti elektronového transportu

Řasová suspence obsahující 3 μmol chlorofylu v mL byla nejprve na ledu jednu hodinu adaptována na tmu. Chlorofylová fluorescence byla měřena pomocí fluorimetru FL-3000 s termoregulátorem TR-2000 (Photon Systems Instruments Ltd., Brno, Česká Republika) jak je popsáno v Shlyk-Kerner et al. 2006. Měřicí kyveta obsahovala 2,4 mL na tmu adaptovaného vzorku řasy.

Teplotní závislost  $Q_A$  reoxidace byla měřena po 2,5 °C v rozsahu 0 až 50 °C. Kritická teplota ( $T_c$ ) byla extrapolována z průsečíků trendů minimální fluorescence měřené během ohřevu vzorku lineární rychlostí 1,5 °C za minutu od 0 do 60 °C.  $T_c$  se nachází v průsečíku lineárního nárůstu fluorescence kulminujícím maximální fluorescencí ( $T_m$ ) a konstantní úrovni fluorescence před fází lineárního nárůstu fluorescence. Poměr  $M/F(30)$  vyjadřuje míru inhibice PSII a je vypočten jako poměr maximální fluorescence  $T_m$  a úrovní fluorescence při teplotě 30 °C.

#### Vývoj kyslíku

Dva a půl mL řasové suspenze obsahující 5 µg chlorofylu na mL byl umístěn do termostátované magneticky míchané kyvety. Vzorek byl z obou stran ozařován regulovatelným modulem s vysoce výkonnými LED ( $\lambda_{\text{červená}} = 625 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{modrá}} = 479 \text{ nm}$ ) poskytující světelné intenzity od 0 do 500 µmol fotonů  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Rychlost vývoje kyslíku byla měřena polarimetricky s pomocí Clarkovy koncentrační elektrody (Hansatech Instruments Ltd., England) s polarizačním potenciálem 700 mV řízeným záznamovým zařízením Oxycorder (Photon Systems Instruments Ltd., Česká republika). Vývoj kyslíku byl měřen každých 5 stupňů v rozsahu teplot od 0 do 35 °C,

#### Příklad 1

Teplotní závislost růstové rychlosti – viz obr. 1

Při teplotách pod 10 °C roste řasa *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 zhruba desetkrát rychleji než mezofilní zástupci téhož rodu (např. *Chlamydomonas reinhardtii*) a zachovává si vyšší růstovou rychlost až po 20 °C. Teprve po překročení teploty 25 °C začíná rychlost růstu klesat o 10 % a teprve při teplotě 35 °C roste sněžná řasa výrazně pomaleji, než příbuzný mezofilní druh. Řasa *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 kultivovaná při nízké ozáření (100 µmol fotonů  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) formou vsádkové kultury tak dosahuje v porovnání vůči příbuznému mezofilnímu kmenu vyšších výtěžků biomasy a to od teplot blízkých zámrazu až po 25 °C a bez znatelné újmy toleruje teploty až 30 °C. Takto teplotně tolerantní kmen je vhodným kandidátem pro biotechnologické využití v otevřených kultivacích v subarktickém pásu.

#### Příklad 2

Manipulace obsahu fosfatidylglycerolu v řase – viz obr. 2, obr. 3

V živočišných tkáních je fosfatidylglycerol (PG) obsažen maximálně 1 až 2 %, s výjimkou plicního surfaktantu, kde může tvořit více než 10 molárních %. Často však tvoří dominantní složku bakteriálních membrán a také je hojný v mitochondriích, jako prekurzor při syntéze kardiolipinu. Rostlinné tkáně obsahují typicky glykolipidy mono- a digalaktosyldiacylglycerol jako dominantní složku membrán. Minoritní složkou je pak sulfochinovosyldiacylglycerol a také PG, vždy však maximálně do molárního podílu 15 %. Řasa *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 obsahuje jako jediný známý fotosyntetický mikroorganismus PG v obsahu převyšujícím ostatní lipidové třídy. Je ale unikátní i v porovnání s ostatními známými organismy tím, že při vsádkové kultivaci za nízké (5 °C) a vysoké (30 °C) teploty přesahuje obsah PG v thylakoidních membránách 90 %. To činí tuto řasu vhodným kandidátem pro biotechnologickou produkci čistého PG.

Příklad 3 – viz obr. 4, obr. 5

Manipulace obsahu mastných kyselin v PG extrahovaného z thylakoidních membrán

Fosfatidylglycerol izolovaný z thylakoidních membrán řasy *Chlamydomonas cf. nivelas* NEDBALOVA 2011/1 obsahuje tři dominantní složky mastných kyselin: kyselinu palmitovou



(16 : 0), olejovou (C18 : 1 (n-9), kyselina oktadecenová) a  $\alpha$ -linolenovou (ALA) (C18 : 3 (n-3), kyselina cis-9,12,15-oktadekatrienová), jež patří mezi takzvané  $\omega$ 3 mastné kyseliny známé svým velkým nutričním významem. ALA je navíc pro savce nejvýznamnější  $\omega$ 3 mastnou kyselinou, jelikož pouze z této mastné kyseliny přijaté ve stravě jsou schopni v omezené míře syntetizovat  $\omega$ 3 mastné kyseliny s delšími řetězci, jako jsou kyseliny eikosapentaenová (EPA) (C20 : 5 (n-3), kyselina cis-5,8,11,14,17-eikosapentaenová) a dokosahexaenová (DHA), (C22 : 6 (n-3), kyselina cis-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová). Vsádková kultivace řasy *Chlamydomonas cf. nivalis* NEDBALOVA 2011/1 při teplotě 5 °C umožňuje extrakci čistého fosfatidylglycerolu obsahujícího kyselinu palmitovou, olejovou a ALA v poměru 1 : 5 : 2. Tento poměr lze změnit kultivací při teplotě 30 °C na 1 : 2 : 3 a tím dosáhnout zvýšení obsahu ALA. Analýza kontrolního kmenu *Chlamydomonas reinhardtii* dokumentuje situaci běžnou u ostatních řas, kde je extrakt lipidů dominován glykolipidy MGDG a DGDG nesoucí širokou škálu mastných kyselin s vyšším podílem kyseliny palmitové, palmitolejové (C16:1(n-7), kyselina cis-9 palmitolejová) a kyseliny cis-7,10,13,16-hexadekatetraenové (C16:4).

Příklad 4 – viz obr. 6

Fyziologická odpověď řasy *Chlamydomonas cf. nivalis* NEDBALOVA 2011/1 na tepelný stres:

Profil teplotní závislosti rychlosti elektronového transportu mezi  $Q_A$  a  $Q_B$  chinony v PSII umožňuje monitorovat integritu dvou klíčových podjednotek PSII, proteinů D1 a D2 skrze informace o termodynamice tohoto procesu a povaze vazeb, kterými obě zmíněné podjednotky interagují. V mezofilní *Chlamydomonas reinhardtii* je elektronový transport urychlován z 2000 s<sup>-1</sup> při 0 °C až po ~ 5300 s<sup>-1</sup> při 42,5 °C, kdy dosáhne maximální hodnoty. Další zvýšení teploty vede ke snížení aktivity PSII s jeho úplnou denaturací nad teplotami 50 °C. *Chlamydomonas cf. nivalis* NEDBALOVA 2011/1 vykazuje mírně vyšší rychlost elektronového transportu mezi  $Q_A$  a  $Q_B$  chinony již při teplotě 0 °C (3000 s<sup>-1</sup>), elektronový transport je exponenciálně urychlován až po teplotu 35 °C na úroveň 11000 s<sup>-1</sup>. Po překročení této teplotní hranice prudce klesá účinnost i rychlost elektronového transportu vedoucí k úplné denaturaci při teplotě 40 °C (obrázek 6). Ze směrnice a průsečíku s osou Y Eyringových grafů změřených dat ( $\ln(k_{QAQB}/T)$  versus  $1/T$ ) lze vypočítat aktivační entalpii  $\Delta H^\ddagger$  a entropii  $\Delta S^\ddagger$  studovaného procesu. Aktivační entalpie  $\Delta H^\ddagger$  v *Chlamydomonas cf. nivalis* NEDBALOVA 2011/1 byla vyšší o 4,78 kJ.mol<sup>-1</sup> (12,29 kJ.mol<sup>-1</sup>) než v *Chlamydomonas reinhardtii* ukazující na silnější vazbu mezi proteiny D1 a D2. Tento efekt je však u *Chlamydomonas cf. nivalis* NEDBALOVA 2011/1 plně kompenzován  $\Delta S^\ddagger$  jenž je o 5,87 kJ.mol<sup>-1</sup> pozitivnější než v mezofilní *Chlamydomonas reinhardtii*, svědčící o zvýšené lokální flexibilitě přechodného stavu [ $Q_A^-Q_B$ ]<sup>‡</sup>, pravděpodobně umožněném flexibilnějším prostředím thylakoidní membrány tvořené převážně PG obsahující polynenasycené mastné kyseliny. Gibbsova volná energie aktivace  $\Delta G^\ddagger$  byla nižší o 1,07 kJ.mol<sup>-1</sup> v *Chlamydomonas cf. nivalis* NEDBALOVA 2011/1 (25,53 kJ.mol<sup>-1</sup>) oproti 26,6 kJ.mol<sup>-1</sup> v *Chlamydomonas reinhardtii*.

Příklad 5 – viz obr. 7

Kritická teplota  $T_c$  a teplota maximální fluorescence  $T_m$  slouží jako ukazatel tepelné deaktivace PSII ale také může odrážet změny ve fyzikálních vlastnostech thylakoidní membrány. Zvyšování kultivační teploty u sněžné řasy *Chlamydomonas cf. nivalis* NEDBALOVA 2011/1 nevedlo prakticky k žádnému zvýšení kritické teploty  $T_c$  a jen k mírnému snížení teploty maximální fluorescence  $T_m$ , na rozdíl od kontrolního kmene *Chlamydomonas reinhardtii*. Tento fakt ukazuje na optimalizovanou funkci PSII u sněžné řasy napříč širokou škálou teplot, na rozdíl od kontrolního kmene, který vykazuje výraznou aklimatizační odpověď při zvyšování kultivační teploty.

Příklad 6 – viz obr. 8

Rychlost vývoje kyslíku je především měřítkem fotochemického výtěžku fotosystému II, kde je molekulární kyslík uvolňován štěpením vody. Při měření s celými buňkami bez přidání umělých elektronových donorů a akceptorů vypovídá tato rychlost o komplexní účinnosti celého fotosyntetického elektron transportního řetězce od molekul vody oxidovaných PSII po CO<sub>2</sub> redukované enzymem Ribuloza-1,5-bisfosfát karboxyláza oxygenáza (RuBisCO). Sněžná řasa *Chlamydomonas cf. nivalis* NEDBALOVA 2011/1 v souladu s měřením růstové rychlosti zvyšovala rychlost vývoje kyslíku od nejnižších naměřených teplot a dosáhla maxima 250 μmol O<sub>2</sub> mg Chl<sup>-1</sup> hodina<sup>-1</sup> při teplotě 25 °C. Následný pokles ukazuje na mírný inhibující vliv teploty nad 30 °C a silný inhibující vliv teploty nad 35 °C na aktivitu PSII a celé fotosyntézy. Kontrolní kmen *Chlamydomonas reinhardtii* vyvíjel do 50 μmol O<sub>2</sub> mg Chl<sup>-1</sup> hodina<sup>-1</sup> při teplotách nižších než 15 °C. Od 20 °C rychlost vývoje kyslíku exponenciálně rostla až po maximální hodnoty, shodné se sněžnou řasou – 250 μmol O<sub>2</sub> mg Chl<sup>-1</sup> hodina<sup>-1</sup>, kterých dosáhl při teplotě 35 °C.

#### Přehled zkratk použitých v textu

PG	fosfatidylglycerol
MGDG	monogalaktosyldiacylglycerol
DGDG	digalaktosyldiacylglycerol
SQDG	sulfochinovosyldiacylglycerol
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
LHCII	světloběrná anténa (light harvesting complex II)

#### Bibliografie

- Apostolova EL, Domonkos I, Dobrikova AG, Sallai A, Bogos B, Wada H, Gombos Z, Taneva SG (2008) Effect of phosphatidylglycerol depletion on the surface electric properties and the fluorescence emission of thylakoid membranes. *J. Photoch Photobio B* 91 (1):51–57.
- Cernansky G, Liau DF, Hashim SA, Ryan SF (1980) Estimation of Phosphatidylglycerol in Fluids Containing Pulmonary Surfactant. *J Lipid Res* 21 (8):1128–1131
- Domonkos I, Laczko–Dobos H, Gombos Z (2008) Lipid-assisted protein–protein interactions that support photosynthetic and other cellular activities. *Prog Lipid Res* 47 (6):422–435.
- Dubertret G, Gerard–Hirne C, Tremolieres A (2002) Importance of trans–Delta(3)–hexadecenoic acid containing phosphatidylglycerol in the formation of the trimetric light–harvesting complex in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol. Bioch* 40 (10):829–836.
- Duchene S, Smutny J, Siegenthaler PA (2000) The topology of phosphatidylglycerol populations is essential for sustaining photosynthetic electron flow activities in thylakoid membranes. *Bba–Biomembranes* 1463 (1):115–120
- El Maanni A, Dubertret G, Delrieu MJ, Roche O, Tremolieres A (1998) Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* affected in phosphatidylglycerol metabolism and thylakoid biogenesis. *Plant Physiol Bioch* 36 (8):609–619
- Gombos Z, Varkonyi Z, Hagio M, Iwaki M, Kovacs L, Masamoto K, Itoh S, Wada H (2002) Phosphatidylglycerol requirement for the function of electron acceptor plastoquinone Q(B) in the photosystem II reaction center. *Biochemistry–Us* 41 (11):3796–3802.
- Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, Broser M, Zouni A, Saenger W (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9–Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct. Mol Biol* 16 (3):334–342.
- Hagio M, Sakurai I, Sato S, Kato T, Tabata S, Wada H (2002) Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43 (12):1456–1464

- Kandasamy P, Zarini S, Chan ED, Leslie CC, Murphy RC, Voelker DR (2011) Pulmonary Surfactant Phosphatidylglycerol Inhibits Mycoplasma pneumoniae-stimulated Eicosanoid Production from Human and Mouse Macrophages. *J. Biol Chem* 286 (10):7841–7853.
- 5 Laczko-Dobos H, Ughy B, Toth SZ, Komenda J, Zsiros O, Domonkos I, Parducz A, Bogos B, Komura M, Itoh S, Gombos Z (2008) Role of phosphatidylglycerol in the function and assembly of Photosystem II reaction center, studied in a *cdsA*-inactivated PAL mutant strain of *Synechocystis* sp. PCC6803 that lacks phycobilisomes. *Biochim Biophys Acta* 1777 (9): 1184–1194.
- Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J (2007) Lipids in photosystem II: interactions with protein and cofactors. *Biochim Biophys Acta* 1767 (6):509–519.
- 10 Morgan-Kiss RM, Priscu JC, Pockock T, Gudynaite-Savitch L, Huner NPA (2006) Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiol Mol Biol R* 70 (1):222–252.
- Numata M, Chu HW, Dakhama A, Voelker DR (2010) Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection. *P Natl Acad Sci USA* 107 (1):320–325.
- 15 Pineau B, Girard-Bascou J, Eberhard S, Choquet Y, Tremolieres A, Gerard-Hirne C, Bennardo-Connan A, Decottignies P, Gillet S, Wollman FA (2004) A single mutation that causes phosphatidylglycerol deficiency impairs synthesis of photosystem II cores in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 271 (2):329–338.
- 20 Raghavendran K, Pryhuber GS, Chess PR, Davidson BA, Knight PR, Notter RH (2008) Pharmacotherapy of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Curr Med Chem* 15 (19): 1911–1924
- Rawlyer A, Siegenthaler PA (1981) Regulation of Photosystem-I Electron Flow Activity by Phosphatidylglycerol in Thylakoid Membranes as Revealed by Phospholipase Treatment. *Biochim Biophys Acta* 638 (1):30–39
- 25 Sato N (2004) Roles of the acidic lipids sulfoquinovosyl diacylglycerol and phosphatidylglycerol in photosynthesis: their specificity and evolution. *J Plant Res* 117 (6): 495–505.
- Sato N, Hagio M, Wada H, Tsuzuki M (2000) Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes. *P Natl Acad Sci USA* 97 (19):10655–10660
- 30 Szalontai B, Kota Z, Nonaka H, Murata N (2003) Structural consequences of genetically engineered saturation of the fatty acids of phosphatidylglycerol in tobacco thylakoid membranes. An FTIR study. *Biochemistry-Us* 42 (14):4292–4299.
- Yang Z, Su X, Wu F, Gong Y, Kuang T (2005) Photochemical activities of plant photosystem I particles reconstituted into phosphatidylglycerol liposomes. *J Photochem Photobiol B* 78 (2):125–134.
- 35

### Průmyslová využitelnost

40 Produkční fotosyntetický mikroorganismus a způsob zvýšení obsahu PG ve fotosyntetickém mikroorganismus podle tohoto vynálezu lze využít pro získávání kvalitního PG pro farmaceutický, kosmetický nebo potravinářský průmysl.

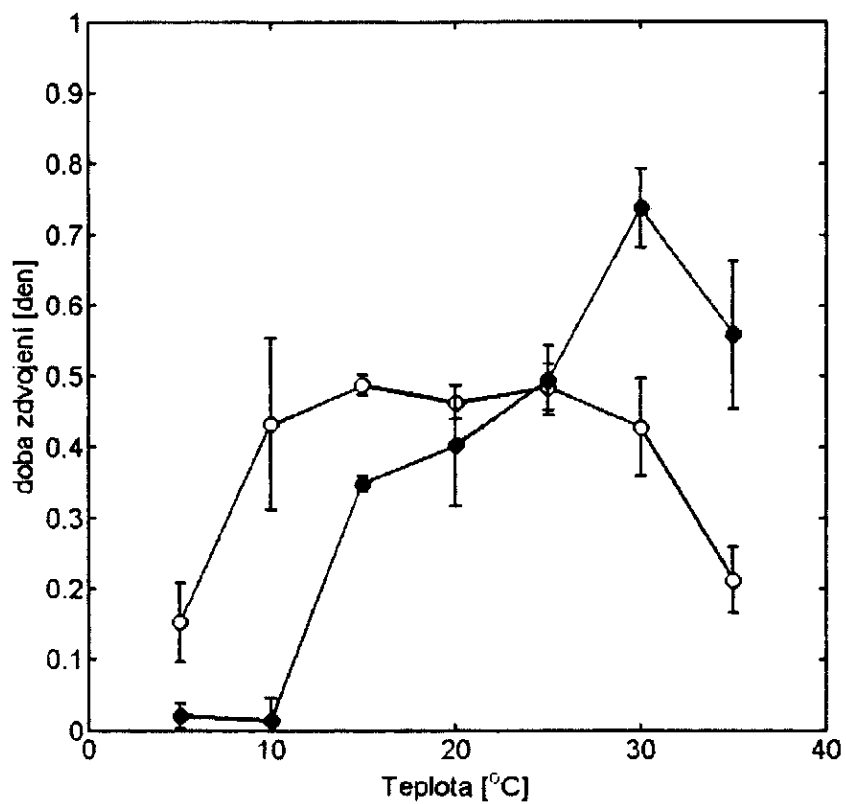
45

### PATENTOVÉ NÁROKY

50 1. Produkční kmen řasy *Chlamydomonas cf. nivalis* pro výrobu fosfatidylglycerolu (PG) uložený ve Sbírce autotrofních organismů Botanického ústavu AVČR, Třeboň, Dukelská 135, pod depozitním číslem vzorku CICALA 970: *Chlamydomonas cf. nivalis* NEDBALOVA, 2011/1.

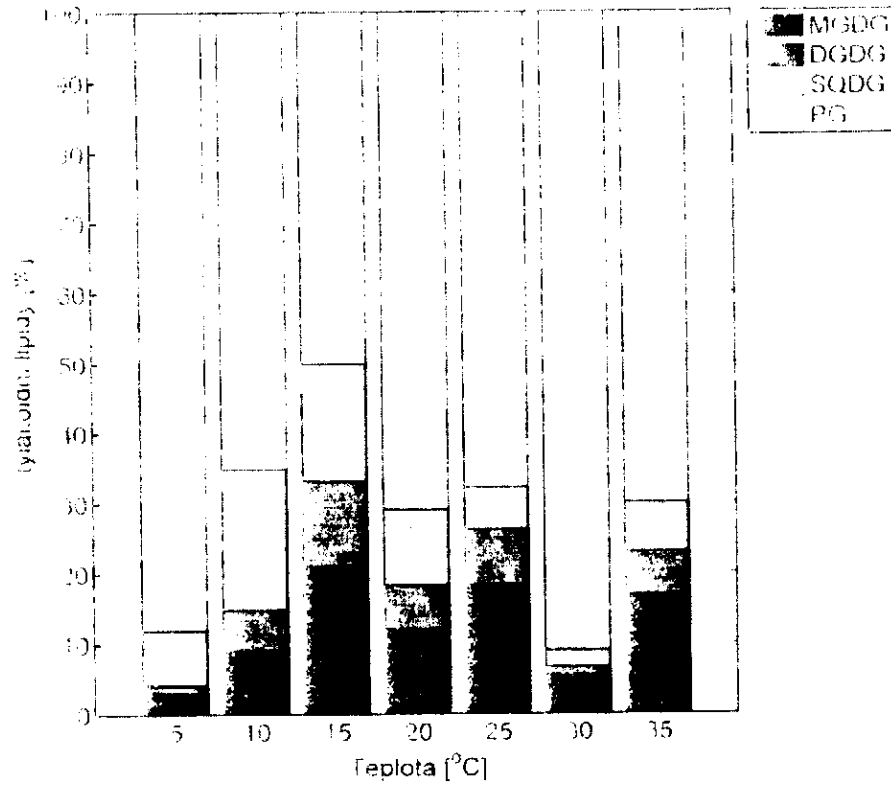
2. Produkční kmen řasy podle nároku 1, kde thylakoidní membrány řasy obsahují více než 80 % molárních fosfatidylglycerolu (PG), a dále lipidy obsažené v těchto thylakoidech obsahují 15 až 55 % molárních kyseliny olejové, 5 až 35 % molárních kyseliny  $\alpha$ -linolenové a 10 % molárních kyseliny palmitové.
3. Použití produkčního kmene řasy podle nároku 1 nebo 2, pro průmyslovou výrobu fosfatidylglycerolu (PG) buněčnou extrakcí z thylakoidních membrán.
4. Způsob zvýšení obsahu PG, kyseliny olejové, kyseliny  $\alpha$ -linolenové v produkčním kmeni řasy podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že fotosyntetický mikroorganismus se vystaví vysokým teplotám v rozmezí 27 až 32 °C nebo nízkým teplotám v rozmezí 0 až 5 °C.
5. Způsob podle nároku 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že vysoké a nízké teploty se střídají.

8 výkresů

**OBR. 1**

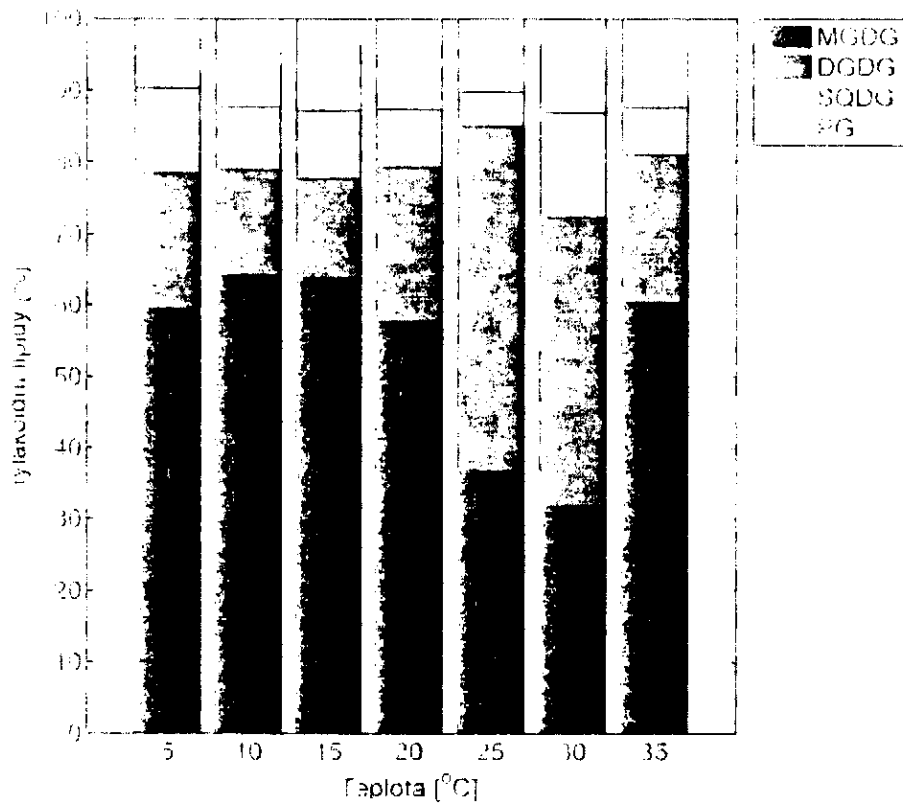
Teplotní závislost růstové rychlosti *Chlamydomonas cf. nivalis* (prázdná kolečka) a *Chlamydomonas reinhardtii* (plná kolečka) vyjádřená jako doba zdvojení řasové populace. Hodnoty představují průměr tří nezávislých měření.

OBR. 2



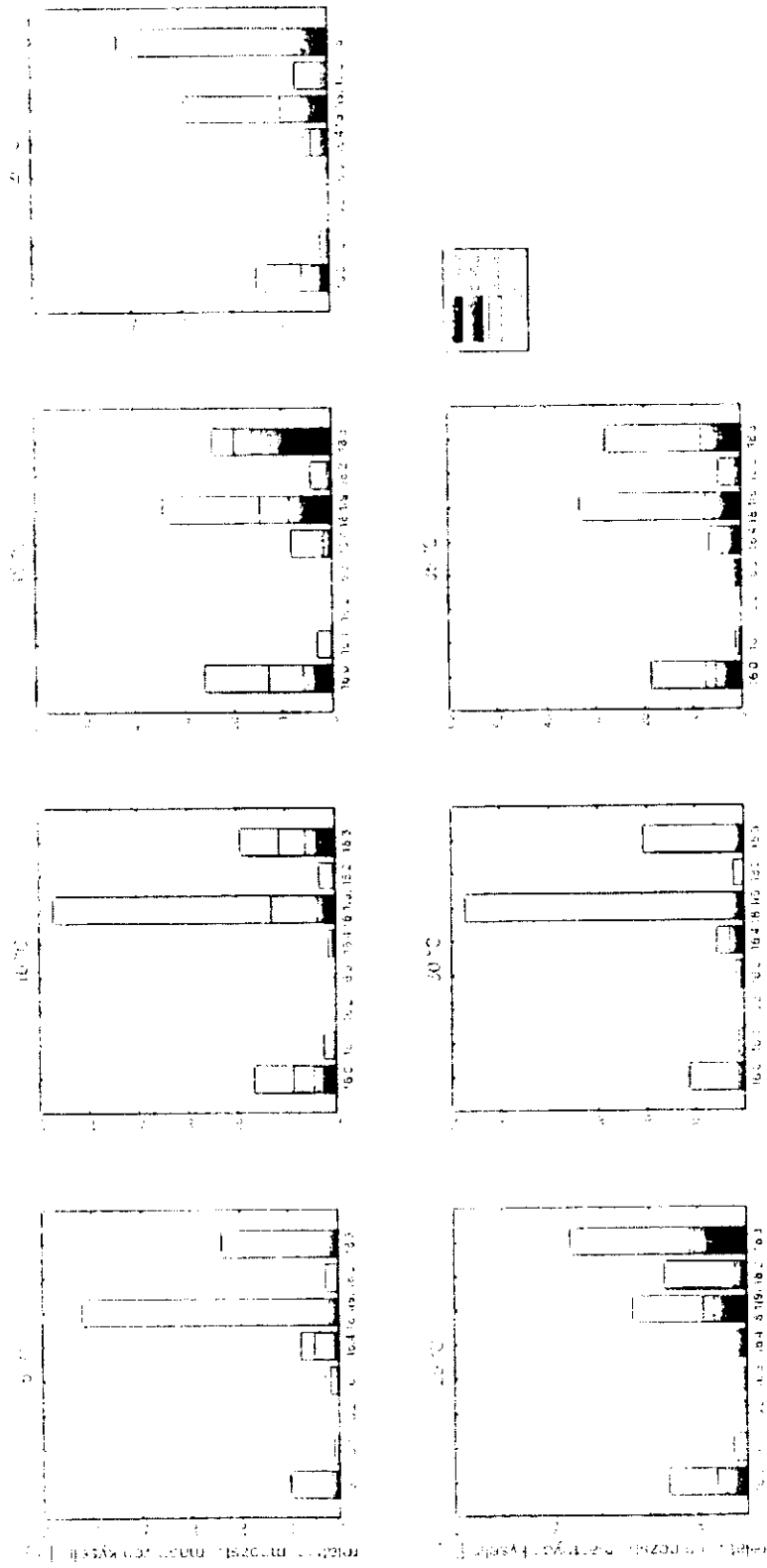
Změny složení lipidů u *Chlamydomonas cf. nivalis* po 72 hodinách aklimace na teplotu od 5 do 35 °C. Hodnoty představují průměr tří nezávislých měření.

OBR. 3



Změny složení lipidů u *Chlamydomonas reinhardtii* po 72 hodinách aklimace na teplotu od 5 do 35 °C. Hodnoty představují průměr tří nezávislých měření.

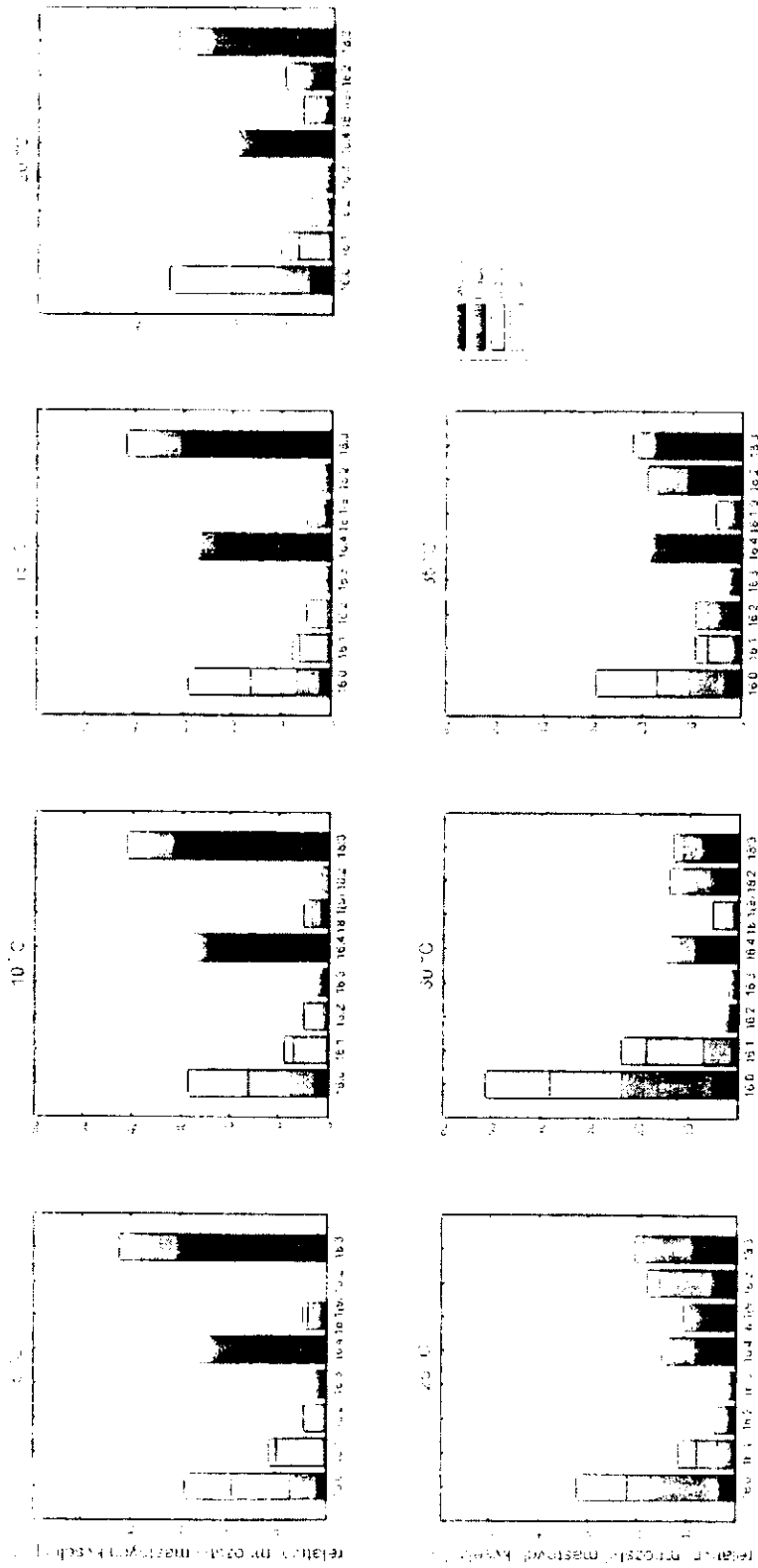
**OBR. 4**



Účteny složením mastných kyselin u *Chlamydomonas cf. rinalis* po 72 hodinách aklimace na teplotu 0u 5 10 16 20 30 35 °C hodnoty představují průměrné úh  
 nezávislých měření.

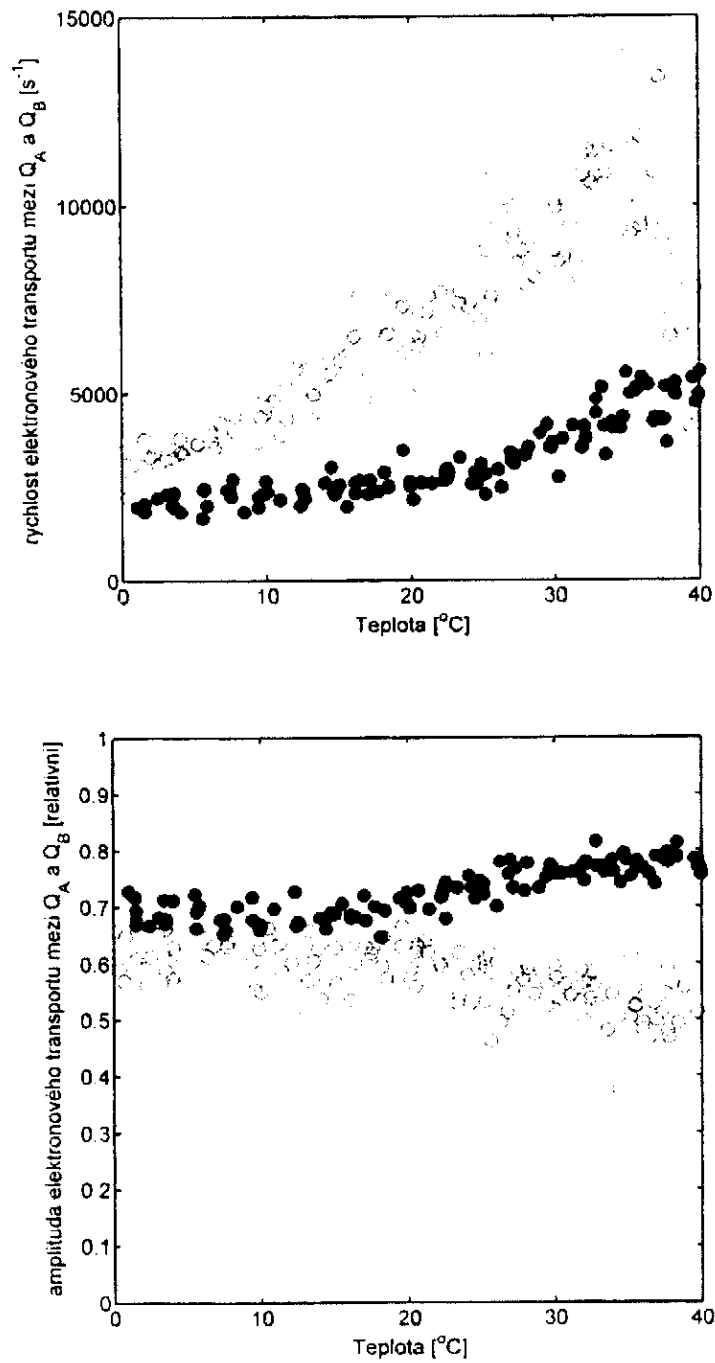


**OBR. 5**



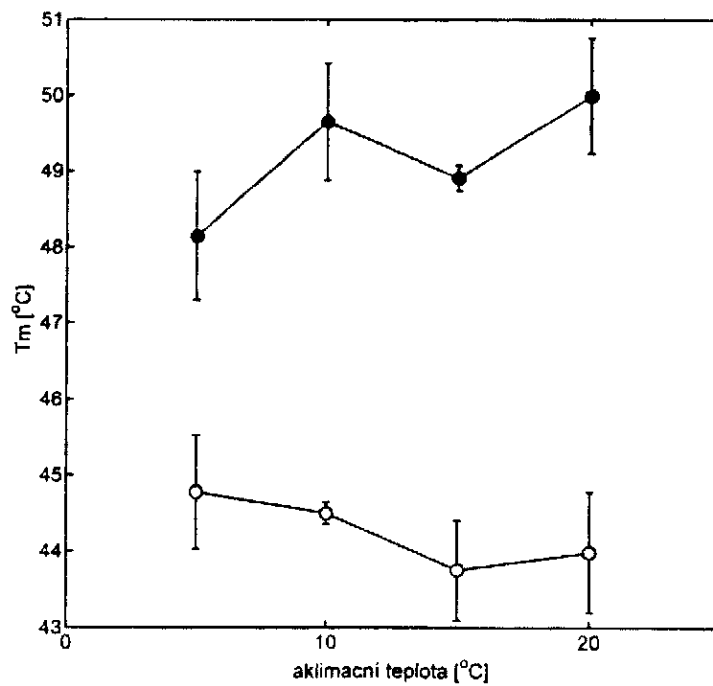
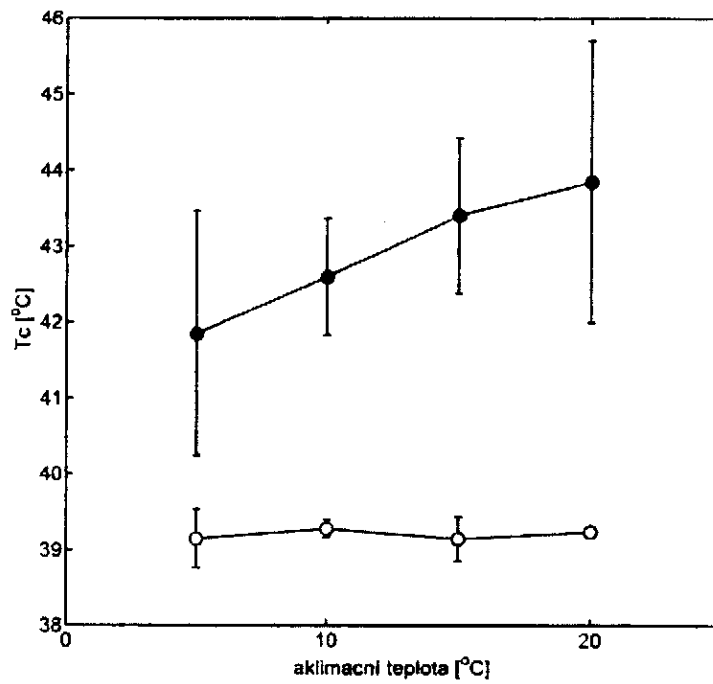
Účinnost působení kyseliny chitinové na teplotě 5 do 40 °C. Hodnoty představují průměr tří nezávislých měření.

OBR. 6

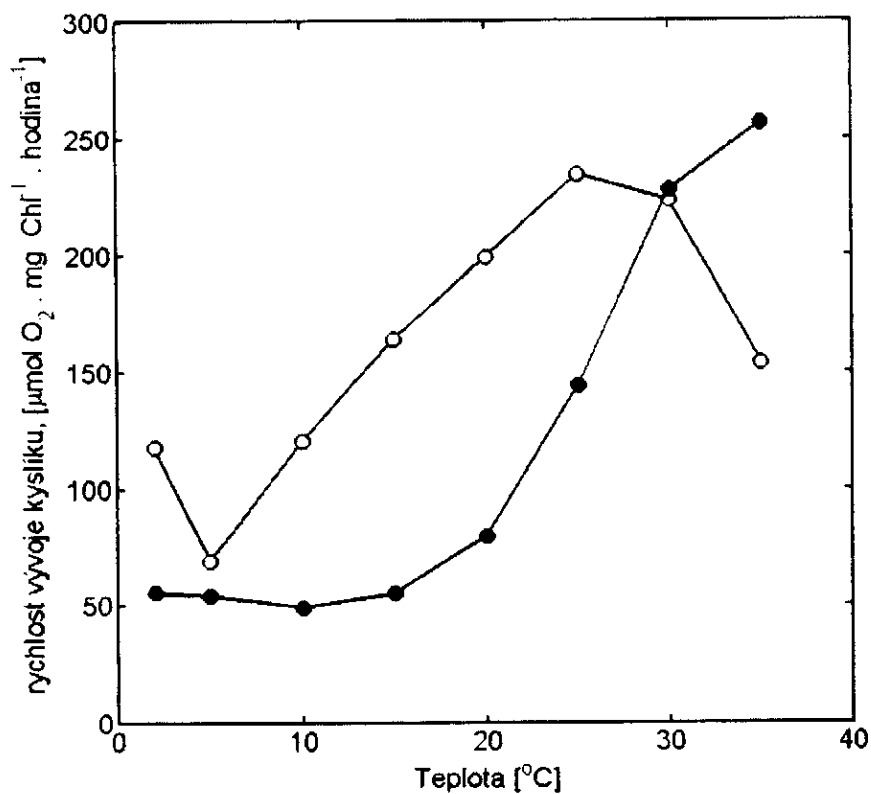


Závislost rychlosti (horní panel) a relativní amplitudy elektronového transportu mezi chinony Q<sub>A</sub> a Q<sub>B</sub> v PSII (dolní panel) na teplotě v *Chlamydomonas cf. nivalis* (prázdná kolečka) a *Chlamydomonas reinhardtii* (plná kolečka). Body představují hodnoty naměřené při nejméně osmi nezávislých měřeních.

OBR. 7



Závislost kritické teploty  $T_c$  (horní panel) a maximální teploty  $T_m$  (spodní panel) na aklimační teplotě u *Chlamydomonas cf. nivalis* (prázdná kolečka) a *Chlamydomonas reinhardtii* (plná kolečka). Hodnoty představují průměr tří nezávislých měření.

**OBR. 8**

Rychlost vývoje kyslíku u *Chlamydomonas cf. nivalis* kultivované při 5 °C (prázdná kolečka) a *Chlamydomonas reinhardtii* kultivované při 24 °C (plná kolečka) a měřené od 2 do 35 °C. Hodnoty představují průměr pěti nezávislých měření

---

Konec dokumentu

---