



Ověřená technologie
Validated technology

Název: Biotechnologický proces zpracování a valorizace odpadního glycerolu pomocí karotenogenních kvasinek
Title: Biotechnological processing and valorization of waste glycerol by carotenogenic yeasts

Autoři: Szotkowski Martin, Márová Ivana
Authors: Szotkowski Martin, Dr., Marova Ivana, Prof.

Potvrzení o převzetí a záměru realizace Ověřené technologie

1. Objednatel - průmyslový subjekt Algae Farm, s.r.o. podpisem tohoto dokumentu prohlašuje, že převzal od Fakulty chemické VUT v Brně Ověřenou technologii s názvem „Biotechnologický proces zpracování a valorizace odpadního glycerolu pomocí karotenogenních kvasinek“ autorů Szotkowski Martin, Márová Ivana (Ústav chemie potravin a biotechnologií) jako součást díla dle objednávky ze dne 30.9.2021.
2. Objednatel prohlašuje, že převzal dokument v rozsahu 23 stran, jehož předmětem je transfer výše uvedené biotechnologie, tedy sada přesně popsanych experimentů, které vedou k optimálnímu výrobnímu postupu kultivace biomasy z kvasinky *Rhodotorula toruloides*. Celý tento výzkum a proces je objektivně popsán a výsledek podrobně odůvodněn.
3. Objednatel si uvědomuje, že experimentální výrobní postup není konečným výrobním postupem, který bude používán při výrobě produktu. Ověřená technologie bude sloužit jako základní východisko a současně návod pro optimalizaci procesu výroby na testovacím výrobním zařízení.
4. V horizontu 1 roku bude dobudováno odpovídající průmyslové vybavení v provozu XXX, kde bude následně ověřená technologie zavedena do výrobního procesu a využívána k produkci obohacené kvasinkové biomasy pro krmné a další účely.
5. Objednatel podpisem tohoto protokolu potvrzuje, že převzal od zhotovitele daňový doklad – fakturu za dílo, jehož součástí je i Ověřená technologie.

Ve dne

.....
(zhotovitel – děkan FCH))

.....
(objednatel - jednatel)

Příloha 2 Smlouvy o spolupráci a objednávky služeb ze dne 30.9.2021

Předmětem transferu je ověřená technologie produkce obohacené kvasinkové biomasy zahrnující přesně popsané experimenty, které vedly k optimálnímu výrobnímu postupu biomasy z kvasinky RT = **výsledek evidovaný v RIV jako "ověřená technologie"** (dle https://www.mpo.cz/assets/cz/podnikani/podpora-vyzkumu-a-vyvoje/2016/11/2-VS_I4_Vysledky---definice-dle-Met-RVVI.pdf).

1. Produkční kmen, charakterizace

Na základě publikovaných screeningových experimentů (viz literární odkazy níže: Kostovová a kol., Chemical Papers 2021; Byrtusová a kol., Microorganisms 2020) byl jako produkční kmen pro průmyslovou produkci obohacené kvasinkové biomasy doporučen kmen ***Rhodotorula toruloides (Banno) CCY 0692-002-001*** získaný z Culture Collections of Yeasts (CHÚ SAV Bratislava). Kmen lze získat pro komerční účely i v jiných sbírkách (DSM 444/4; CBS 6016; IFO 8766; NBRC 8766; NRRL-Y-6987).

Jde o karotenogenní kvasinku vyznačující se dostatečnou stabilitou růstu a produkce, vhodnými nároky na kultivační podmínky, netoxickým charakterem, aerobním metabolismem a schopností využít celou řadu substrátů včetně odpadních substrátů. Na tento kmen nejsou stanoveny žádné restrikce dle Nagoya Protocol.

Literární odkazy:

- KOSTOVÁ I., BYRTUSOVÁ D., RAPTA M., BABÁK V., MÁROVÁ I.: The variability of carotenoid pigments and fatty acids produced by some yeasts within Sporidiobolales and Cystofilobasidiales *CHEMICAL PAPERS* 2021, DOI: 10.1007/s11696-021-01567-1
- BYRTUSOVÁ D., SHAPAVAL V., HOLUB J., ŠIMANSKÝ S., RAPTA M., SZOTKOWSKI M., KOHLER A., MÁROVÁ I.: Revealing the Potential of Lipid and beta-Glucans Coproduction in Basidiomycetes Yeast. *MICROORGANISMS* 8 (7), 2020, Article Number: 1034. DOI: 10.3390/microorganisms8071034

2. Uchovávání a revitalizace produkčního kmene

Produkční kmen byl dodán ve frmě lyofilizovaného prášku nebo tablet. Revitalizace byla provedena dle návodu dodavatele (příslušné sbírky mikroorganismů), obvykle resuspendací lyofilizátu ve vhodném objemu inokulačního média, kultivací v tekutém médiu po dobu 48 hod a opakovaným pasážováním na Petriho miskách se sterilním YPD agarem (2% agar v YPD inokulačním médiu – Tabulka I). Po ověření čistoty kultury lze krátkodobě uchovávat kulturu na Petriho miskách při 6°C, pro dlouhodobé uchovávání je vhodnější lyofilizace kultury získané z tekutého média a uchování při -80 °C (viz dále).

Pro přípravu inokula bylo použito komplexní médium s obsahem kvasničného autolyzátu.

Tabulka 1: Složení YPD média pro přípravu revitalizačního inokulačního média

Složka	Množství
Voda	1000 ml

Kvasničný autolyzát	10 g
Pepton	20 g
Glycerol	20 g
pH	6,5
Teplota	25 °C

Biomasa byla z tekutého média izolována centrifugací (10,000 rpm, 3 min), dvakrát promyta destilovanou vodou, zmražena na -80 °C a lyofilizována. Množství biomasy bylo stanoveno gravimetricky a vyjádřeno jako suchá váha buněk (cell dry weight, CDEW). V lyofilizované formě byl kmen rovněž uchováván při -80 °C v hlubokomrazícím boxu.

3. Kultivace inokula v laboratorních podmínkách – v baňkách a fermentorech

3.1 Složení kultivačních médií pro inokulace

V Erlenmeyerových baňkách byly prováděny veškeré optimalizace složení média a podmínek i příprava inokula pro fermentorové a velkoobjemové kultivace.

Složení základního inokulačního média pro inokulace I až III (viz dále, Inokulační postup) je uvedeno v Tabulce 2, v dalším textu (Tabulka 2, Tabulka 3) jsou uvedena složení média pro inokulum IV a kultivační podmínky včetně způsobu převodu inokula do objemu 20 l.

V závislosti na potřebném objemu inokula k zaočkování kultur v kultivačních lahvích, laboratorních fermentorech nebo v průmyslovém reaktoru bylo připraveno příslušné množství inokula při dodržení inokulačního poměru 1:5. Inokulum je vhodné kultivovat do dosažení konce exponenciální fáze (nebo přechodu z exponenciální do stacionární fáze; obvykle 46 – 60 hodin, podle typu kultivace).

Tabulka 2: Složení YPD média pro přípravu inokula I - III

Složka	Množství
Voda	1000 ml
Kvasničný autolyzát	10 g
Pepton	20 g
Glycerol	20 g
pH	6,5
Teplota	25 °C

Tabulka 3: Médium pro poslední inokulační krok – Inokulum IV

Složka	Množství
Voda	1000 ml
Kvasničný autolyzát	2 g
Pepton	2 g
Glycerol	45,46 g
KH ₂ PO ₄	4 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,696 g
NaNO ₃	5,1238 g
Mikroelementový roztok	2 ml

Tabulka 4: Složení mikroelementového roztoku pro kvasinky

Složka	Množství (mg) do 1L roztoku
H ₃ BO ₃	1,25
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,1
KI	0,25
MnCl ₂ 4 H ₂ O	0,82
FeCl ₃	0,3
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4 H ₂ O	0,5
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	1

3.2 Inokulační postup

Postup přípravy inokula je uveden postupně pro přípravu až 20 l inokula; pro menší objemy inokula je třeba odpovídajícím způsobem zmenšit objemy kultivačních médií tak, aby byl dodržen poměr objemů narostlé kultury a nového média (1 : 5) a objemy kultivačních nádob tak, aby kultura měla dostatek kyslíku. Inokulační postup byl optimalizován tak, aby došlo k maximálnímu nárůstu bohatého inokula, což je zásadní vstupní předpoklad pro kvalitní kultivaci.

1. Inokulum I:

Vychází ze zásobní kultury na Petriho misce živé buňky, křížový roztěr). Z YPD misky s natřenou rozrostlou kulturou je třeba přeočkovat do Erlenmeyerovy baňky o objemu maximálně 500 mL s maximálně 100 ml média 20 velkých kliček (1 klička na 5 ml); případně lze zmenšit objem média příslušně i množství kultury (20 ml + 3-5 kliček, 50 ml + 5-8 kliček) a pasážovat dále v poměru 1:5.

Pozn: Prvotní inokula (složení média viz Tabulka 2) je potřeba udělat v několika opakováních z důvodu vyloučení kontaminace, popřípadě použít jako přídavek velmi malé množství antibiotik (Ampicilin).

2. **Inokulum II:** Po mikrobiální kontrole je třeba převést inokulum I po 24 hodinách kvantitativně do aerované 1L Pyrex láhve s 500 ml YPD média. Tento objem slouží k zaočkování laboratorního fermentoru o celkovém objemu 3000 ml média. Menší objem inokula lze převést do menšího objemu inokula II v poměru 1:5 (např. pro kultivace v Erlenmeyerových baňkách se převede 20 ml inokula I do 100 ml inokula II a kultivuje 24 hod).

3. **Inokulum III:** Pro přípravu inokula do průmyslového reaktoru je třeba po 24 hodinách převést kvantitativně 500 ml inokula II do aerované 5L Pyrex láhve s 3000 ml YPD média. Kultivace probíhá 24 hod.

4. **Inokulum IV:** Po 24 hodinách je třeba Inokulum III převést do aerované Láhve 20L Pyrex s 16 500 ml média pro Inokulum IV (Tabulka 3, Tabulka 4).

4. Kultivace v produkčním médiu

4.1. Produkce biomasy a metabolitů v laboratorním měřítku

V Tabulce 18 je uvedeno složení optimalizovaného média tak, jak bylo otestováno pro průmyslové kultivace. V tomto médiu byla srovnána produkce cílových metabolitů v Erlenmeyerových baňkách a v laboratorním fermentoru o objemu 1,5 l (Tabulka 19) po dobu kultivace 96 hod. Z tabulky je patrné, že ve fermentoru bylo dosaženo vyšších hodnot biomasy (13,5 g/l v 1,5 l fermentoru vs 8-10 g/l v baňkách) i cílových metabolitů.

Tabulka 5:: *Optimalizované produkční médium*

Složka	Množství
Voda	1000 ml
Glycerol	92,50 g
KH ₂ PO ₄	8 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,392 g
NaNO ₃	10,24 g
Mikroelementový roztok	2 ml

pH	6,5
Teplota	25°C

Tabulka 6: Srovnání výtěžků R.T. na glycerolu – Erlenmeyerovy lahve vs fermentor 1,5 L

	Beta karoten	Torularhodin	Torulen	Celkové karotenoidy	Ubichinon	Ergosterol
Erl. baňky	0.262 ± 0.02	2.745 ± 0.21	0.210 ± 0.02	4.961 ± 0.436	3.371 ± 0.31	1.881 ± 0.14
fermentor	0.467 ± 0.04	2.650 ± 0.23	0.118 ± 0.01	6.484 ± 0.651	5.479 ± 0.59	2.318 ± 0.21

Souhrnné výtěžky R.toruloides na glycerolu – baňky; fermentor 1,5 L; kultivace 96 hod

- Biomasa 13,5 g/L
- Lipidy 15 % - 25 % v biomase
- Poměr SFA:MUFA:PUFA 38: 58 : 4
- beta-glukany 13 % - 18 % v biomase
- proteiny 25-35 %
- aminokyseliny všechny

V další fázi byla kultivace převedena do laboratorního fermentoru o objemu 5000 ml. Kultivace probíhala na optimalizovaném médiu po dobu 6 dní a 7 dní. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 20.

Tabulka 7: Srovnání výtěžků R.T. ve fermentoru o objemu 5 000 ml za 146 n a 168 hodin

Čas Hod	Beta karoten	Torularhodin	Torulen	Celkové karotenoidy	Ubichinon	Ergosterol
146	0.842 ± 0.06	0.379 ± 0.03	8.012 ± 0.58	9.715 ± 1.06	9.520 ± 1.32	10.295 ± 1.66
168	0.453 ± 0.03	0.418 ± 0.03	9.146 ± 1.08	10.514 ± 1.42	10.195 ± 0.87	10.952 ± 1.38

Výtěžky R.toruloides na glycerolu – laboratorní fermentor 5 L; kultivace 7 dní

- Biomasa 18,8 g/l (164 HOD)
- Lipidy 24%
- SFA:MUFA:PUFA 11:27:62
- Beta-glukany 15%

Kultivace v 1,5 l fermentoru neposkytla dostatečné výtěžky na jednoduchém glycerolovém médiu. Na optimalizovaném médiu s přidavkem mikroelementového roztoku, optimalizovaným C/N poměrem a zdrojem dusíku bylo dosaženo podstatně vyšší produkce cílových metabolitů i biomasy (Tabulka 19). Kultivace v 5-litrovém fermentoru poskytla výsledky produkce ergosterolu, karotenoidů i ubichinonu cca 10 mg/g sušiny při

produkci biomasy cca 19 g/l, zastoupení lipidů 24 % a beta-glukanů 15%, Tyto výsledky jsou průmysově zajímavé a proto byla technologie převedena postupně do velkého měřítka.

4.2. Kultivace v produkčním médiu – poloprovozní měřítko , příprava inokula do objemu 20 L

Tabulka 8: Produkční médium pro velkoobjemovou kultivaci a podmínky

Složka	Množství
Voda	1000 ml
Glycerol	92,50 g
KH ₂ PO ₄	8 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,392 g
NaNO ₃	10,24 g
Mikroelementový roztok	2 ml
pH	6,5
Teplota	25°C

Postup pro kultivaci v produkčním médiu:

V úvodu je třeba zaočkovat 500 L produkčního média 20 L Inokula a poté druhý dne doplnit zbylých 500 L produkčního média.

Kultivaci je třeba vést po dobu 96 hodin. V pravidelných intervalech je nutné odebírat vzorky na stanovení optické hustoty a následně je poté lyofylizovat a uschovat pro pozdější analýzy složení biomasy.

5. Kultivace v poloprovozním zařízení a optimalizace procesu

5.1 Procesní parametry – optimalizace:

V následujícím textu je popsán způsob optimalizace velkoobjemové kultivace, která probíhala dílem v laboratořích FCH VUT v Brně a dílem ve výzkumném centru Algatech v Třeboni. Optimalizace byla provedena tak, že výsledky z každé velkoobjemové kultivace byly kriticky zhodnoceny, navržen optimalizační krok a otestován v laboratořích FCH VUT v Brně. V dalším textu je uveden podrobně postup optimalizace u tří následných velkoobjemových fermentací včetně diskuse problémů, jejich příčin a návrhu technického řešení.

Jednotlivé kultivace jsou popsány z hlediska provedených podmínek, složení média, samotného kultivačního procesu a zhodnocení kultivace z hlediska produktivity a navržení opravných postupů pro navýšení produkce. Zároveň jsou zde popsány navazující experimenty, které probíhaly na fakultě chemické a sloužily jako podpora a rozvoj výzkumu v této oblasti.

5.2 Prosinec 2021 – leden 2022: 1 . velkoobjemová kultivace

Příprava inokula:

Byla provedena příprava inokula pro velkoobjemovou kultivaci. Složení média, proces kultivace a kultivační podmínky jsou uvedeny v 0. Inokulace byla provedena v termínu 6-9. ledna. Na počátku druhého týdne v lednu 10. ledna bylo inokulum o objemu 20 L převezeno do Třeboně a zaočkováno do velkoobjemového reaktoru s 1000 L média. Médium bylo založeno na odpadním glycerolu poskytnutém z výroby biopaliv (methylesterů mastných kyselin z odpadního kafilerního tuku).

Tabulka 9: Složení média použitého pro první velkoobjemovou kultivaci

Voda	1000 ml
Glycerol*	45.41 g
KH ₂ PO ₄	4.00 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.696 g
Močovina	1.91 g
pH	6,5
Teplota	25°C

Odpadní glycerol*

Průběh první velkoobjemové kultivace:

Na počátku kultivace byl po zaočkování a spuštění vzdušnění pozorován vznik intenzivní pěny. Pěna dosahovala zhruba výšky 1 metru a i po snížení intenzity provzdušňování klesala jen velmi pomalu. Po dohodě s obsluhou fermentoru bylo přidáno další množství antifoam (protipěnové látky), tvorba pěny se snížila a stabilizovala zhruba na 15-20 cm výšky. V průběhu kultivace byl zjištěn jen malý nárůst kultury, pozvolný a nízký. Nebyla pozorována standardní sigmoidní křivka růstu s výraznou exponenciální fází. V rámci první velkoobjemové kultivace bylo odebráno 5 L odpadního glycerolu a převezeno do Brna na FCH, kde na odpadu byly dále prováděny testy.

Zhodnocení první kultivace a důležité poznatky:

Důvod nízké produkce biomasy byl primárně dán vysokou tvorbou hutné pěny, která bránila efektivnímu promíchání inokulační kultury s novým produkčním médiem. Velká část kvasinek se tak nedostala do kontaktu s médiem a po čase došlo k jejich inhibici a úmrtí. Tyto kvasinky zůstaly i po sražení pěny přidáním antifoam látky na stěnách nádoby a nedostaly se do média. Do média se okamžitě po zaočkování dostala reálně velmi malá část kvasinek a výsledný inokulační poměr nebyl 1:100, ale spíše 1:1000 až 1:10000. Vysoká pěnivost odpadního glycerolu byla identifikována jako výrazný problém pro danou kultivaci, který je nutné dále řešit. Byly proto navrženy experimenty s odpadním glycerolem, které budou diskutovány v další části zprávy.

Důležitým zjištěním bylo, že kvasinky byly schopny přežít i při nízkém očkovacím poměru v médiu obsahujícím odpadní glycerol. Následně bylo doplněno složení primárních látek v použitém odpadním glycerolu: glycerol cca 30%, methanol 3-4 %, zbytky solí mastných kyselin. Na základě výsledků obsažených ve zprávě o kultivaci od dr. Kubáče byla dohodnuta následující optimalizace kultivace s použitím čistého glycerolu.

5.3 Optimalizační experimenty na FCH navazující na první velkoobjemovou kultivaci:

V návaznosti na výsledky první kultivace bylo v Třeboni vyzvednuto 10 L odpadního glycerolu, který byl dále testován a studován jeho vliv na kultivaci a produkci biomasy kvasinkou *R. toruloides*.

Hlavními cíli bylo:

1. Optimalizovat proces kultivace a eliminace tvorby pěny, či její minimalizace na únosnou úroveň, která by neovlivnila proces kultivace.
2. Provést základní série kultur na tomto substrátu – na použité kvasinice nebyl odpadní glycerol nikdy v laboratoři testován, až ve velkoobjemové kultivaci.
3. Provézt analýzu tohoto odpadního materiálu a identifikovat přesněji složení a možné zdroje uhlíku, popř. dusíku.

Ad. 1. Tvorba pěny je velmi limitující jev při biotechnologické kultivaci a ovlivňuje celou řadu parametrů. V našem případě, jak bylo zmíněno na začátku, byl hustý vysoký sloupec pěny vytvořený hned po startu kultivace obstrukcí pro kvasinky, které byly očkované z horního portu. Velká část kultury se nedostala do submerzní kultivace a postupně v pění s nedostatkem živin. Toto bylo primárním důvodem slabé produkce biomasy. Dále pěna v průběhu kultivace ovlivňuje přístup živin a může způsobovat, že buňky kvasinek jsou vzneseny nahoru mimo médium a poté umírají. Ztráty v tomto případě mohou být do 15 %.

Redukce pěny byla testována dvěma způsoby:

- přídavek většího množství antifoamu (proti pěnové látce) do média. Je to rychlé řešení a poměrně jednoduché – problém spočívá v tom, že antifoam má také efekt na kvasinky, který je primárně negativní. Průmyslově používané antifoamy jsou na bázi silikonových olejů, které jsou pro kvasinky nepřírodní a mohou tak poškozovat či ovlivňovat metabolismus a růst. Existují kmeny, či druhy, které jsou na vybrané typy antifoamu velmi citlivé a i nízká koncentrace může vést k úmrtí celé kultury. V samotných kulturách to bylo řešeno následovně: obecně používaná koncentrace antifoamu 0.01-0,05 % byla zvýšena na 0,2-0,5 %.
- druhým přístupem, který vycházel ze znalostí složení odpadního glycerolu (zbytkový obsah mýdel a volných mastných kyselin) je regulace množství tohoto substrátu v médiu v průběhu kultivace, tedy volba systému Fed-Batch, kdy byl glycerol přidáván postupně do kultivace.

Provedené laboratorní experimenty byly rozděleny na dvě části:

- o První část: Kultivace v třepaných baňkách byla založena na otestování různých koncentrací odpadního glycerolu v médiu. Bylo testováno, kolik tohoto substrátu kultura kvasinek snese, aniž by uhynula. Složení kultivačního média a obsahu odpadního glycerolu je uvedeno níže i s dosaženými výsledky. Zde byly experimenty provedeny v duplikátech.

Tabulka 10: Modifikované složení média s odpadním glycerolem

Voda	1000 ml
Odpadní glycerol*	30 g
KH ₂ PO ₄	4 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.696 g
Močovina	1.91 g
pH	6,5
Teplota	25°C

Tabulka 11: Design experimentu – obsah odpadního glycerolu v médiu

Baňka	Médium	Biomasa g/l
1. baňka	50 %	9,68±0,98
1. kontrola	100 %	12,54±1,32
2. baňka	125 %	14,85±1,78
3. baňka	150 %	16,42±1,03
4. baňka	175 %	16,84±1,45
5. baňka	200 %	15,98±1,32
6. baňka	250 %	16,23±0,98
7. baňka	300 %	16,02±1,56

- Druhá část: Kultivace ve fermentoru, kde byl sledován vliv množství odpadního glycerolu na kulturu a v dalších sériích i postupné fed-batch kultivace s rozdílnými přídávky odpadního glycerolu. Na základě těchto výsledků byly poté prováděny kultivace s využitím fed-batch, kdy proces přidávání odpadního glycerolu byl řízen pomocí rozpuštěného kyslíku. Zjednodušeně – v průběhu kultivace je řízen obsah rozpuštěného kyslíku, tzv. pO₂ hodnota. Standardně byly v kultivaci nastaveny tyto podmínky:

Tabulka 12: Kultivační podmínky pro fed-batch kultivaci.

Podmínky	Hodnoty
pH	6,5
Teplota	25 °C
pO ₂	20 %
Míchání	Základní 400 ot/min
pO ₂ <20 %	400-800 ot/min
pO ₂ >30%	Pumpa s odp. glycer. 5 ml/min
Objem média ve fermentoru	2 L

Výsledky produkce biomasy: cca 15,8 – 17 g/L; posléze bylo dosaženo až 20 - 21 g/L.

Tabulka 13: Složení biomasy – první velkoobjemová kultivace

PARAMETR	OBSAH
Produkce suché biomasy (CDW, g/L)	16,5 g/l
Obsah bílkovin v sušině	25,8 %
obsah lipidů v sušině	19,8%

PUFA:MUFA:SFA (%)	9 :46:45
Obsah beta-glukanů v sušině	12,2 %
Obsah alfa-glukanů v sušině	3,2 %
beta-karoten (mg/g suš.)	0,78
celkové karoteny (mg/g suš.)	2,35
torulen	1,41
torularhodin	0,16
ubichinon (mg/g suš.)	0,82
ergosterol (mg/g suš.)	2,35

Diskuse první série optimalizačních experimentů:

První velkoobjemová kultivace v Třeboni přinesla velmi nízké výtěžky biomasy z výše uvedených důvodů. Optimalizační experimenty s odpadním glycerolem v Erlenmeyerových baňkách vedly ke zjištění, že kvasinka *R. toruloides* je schopna tento odpad zpracovávat a je odolná i vůči vyšším koncentracím tohoto substrátu v médiu. Problém tvorby vysoké pěny v aerovaném fermentoru byl eliminován navýšením množství protipěnové látky a rozložením množství odpadního glycerolu přidávaného v médiu v různých intervalech v průběhu celé kultivace. Jako velmi zajímavá možnost se ukázala možnost regulovaného dávkování odpadního substrátu do média v závislosti na množství rozpuštěného kyslíku. Z naměřených experimentálních dat a dat z bioreaktorových senzorů, reagovala kultura velmi aktivně na přidání nového čerstvého substrátu do média. Tato reakce byla velmi rychlá a byla pozorovatelná již od první mnuty od začátku pumpování čerstvého odpadního glycerolu. Tento systém s kontinuálním přidáváním umožnil kvasinkám zpracovávat všechny uhlíkaté substráty obsažené v dodaném odpadním materiálu, a to jmenovitě glycerol, soli mastných kyselin a methanol. Díky tomuto systému kultivace se v médiu přílišně nehromadily soli mastných kyselin (mýdla), které mají inhibiční účinek na kvasinky a zároveň způsobují zvýšenou pěnovost média.

5.4 Únor 2022: 2. velkoobjemová kultivace v Třeboni

Na základě optimalizačních experimentů byla provedena příprava inokula pro další velkoobjemovou kultivaci. Složení média, proces kultivace a kultivační podmínky jsou uvedeny v tabulkách 1 - 4. Inokulace byla provedena v termínu 11. ledna. Na počátku druhého týdne v lednu 14. února bylo inokulum o objemu 20 L převezeno do Třeboně a zaočkováno do velkoobjemového reaktoru s 500 L média. V průběhu kultivace ve 48. hodině bylo poté přidáno zbylých 500 L média. Médium bylo založeno na čistém glycerolu.

Zhodnocení druhé velkoobjemové kultivace

Základním výsledkem byla nízká produkce biomasy, kdy dle zprávy obsluhy fermentoru byl růst kultury zastaven již po necelém 1 dni kultivace. Zde kultura v médiu narazila na limit v některé z živin, který byl zřejmě způsoben naředěním/zvýšením inokulačního poměru. Menší obsah kvasničného autolyzátu v médiu neposkytl dostatek živin a došlo tak k limitaci růstu a k nízké produkci biomasy.

Tabulka 14: Charakterizace obohacené biomasy – velkoobjemová kultivace 2

SKUPINA	OBCHODNÍ NÁZEV/ÚČINNÁ LÁTKA	DENNÍ DOP. DÁVKA MG	OBSAH ÚČINNÉ LÁTKY MG/G BIOMASY	% DENNÍ DÁVKY OBSAŽENÉ V 1 G	% DENNÍ DÁVKY OBSAŽENO V 1 TABLETĚ 500 MG
ESENCIÁLNÍ AMINOKYSELINY	Methionin	1500	2,9	0,2%	0,10%
	Valin	3000	8,9	0,3%	0,15%
	Lysin	1000	9	0,9%	0,45%
	Isoleucin	1000	7,5	0,8%	0,38%
	Fenylalanin	1500	7,3	0,5%	0,24%
	Leucin	2000	11,3	0,6%	0,28%
	Threonin	500	7,5	1,5%	0,75%
	Histidin	3000	8,4	0,3%	0,14%
	Arginin	3000	7	0,2%	0,12%
		69,8			
NEESENCIÁLNÍ AMINOKYSELINY	Glutamát	1000	18,9	1,9%	0,95%
	Glycin	500	10,9	2,2%	1,09%
	Alanin	3000	11,1	0,4%	0,19%
	Aspartát	8	13,1	163,8%	81,88%
	Thyrosin	1000	4	0,4%	0,20%

	Prolin	1000	7,8	0,8%	0,39%
	Serin	1500	8,2	0,5%	0,27%
	74				
Lipidy	SFA		62		
	MUFA		120		
	PUFA		120		
	302				
Betaglukany		150	160	107%	
Mannanové oligosacharidy			210		
Minerály	P,K,Ca,Fe, Na,K		75		
	Se, Mn,Cr, Ni,Cu,Va		0,84		
Minoritní metabolity	provitamin A	1	3,5	350%	175,00%
	provitamin D/vitamin D3	0,005	7,5	150 000%	75 000%
	Koenzym Q10	10	7	70%	35,00%
	Vitaminy B	2	0,13	6,5%	3,25%
	Vitaminy E	20	1	5,0%	2,50%

5.5 Druhá série optimalizačních experimentů realizovaná na FCH v návaznosti na

2.velkoobjemovou kultivaci

Další možností a zdrojem problémů bylo inokulační médium a inokulační poměr, který byl hlavní proměnnou v přenosu z malého objemu do velkého objemu, kdy byl inokulační poměr z 1:10 zvýšen skokově na 1:50; 1:100. Na základě toho se optimalizační experimenty zaměřily na vliv inokulačního média a jeho složek na kultivaci. V rámci experimentu byla stejná kultura zaočkována různými inokulačními poměry (1:5; 1:10; 1:20; 1:50; 1:100) a byl sledován vliv ubývajícího množství bohatého inokula přenášeného do produkčního média. Z výsledků níže v tabulce 12 je patrné, že zejména od inokulačního poměru 1:50 a výše již dochází ke snížené produkci biomasy a tudíž jisté živiny v médiu začínaly kvasinkám chybět a následovala limitace růstu. Vzhledem k tomu, že kvasinky jsou si schopny syntetizovat si většinu základních molekul a vitamínů, logicky vyplynula potřeba zaměřit se na množství mikroprvků/mikroelementů. V rámci experimentu byl vybrán a testován základní mikroelementový roztok, jehož složení je uvedeno v tabulce 28. Složení mikroelementového roztoku vycházelo z dřívějších publikací.

Tabulka 15: Mikroelementový roztok

Složka	Množství [g/l]
H ₃ BO ₃	1,25
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,10
KI	0,25
MnCl ₂ 4 H ₂ O	0,82
FeCl ₃	0,30
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4 H ₂ O	0,50
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	1,00

Tabulka 16: Návrh na testování růstu na médiích o různém složení

1.	Kontrolní médium	Standardní složení	Očkovací poměr 1:10
2.	Kontrolní médium	Standardní složení + 50 uL mikroelement roztoku	Očkovací poměr 1:10
3.	Kontrolní médium	Standardní složení + 50 uL mikroelement roztoku	Očkovací poměr 1:20
4.	Kontrolní médium	2xGlyc + 2x močovina + 100 uL mikroelement roztoku	Očkovací poměr 1:10
5.	Kontrolní médium	2xGlyc + 2x močovina + 100 uL mikroelement roztoku	Očkovací poměr 1:20
6.	Kontrolní médium	Standardní složení	Očkovací poměr 1:20
Média s jiným zdrojem dusíku - dusičnan			
7.	Médium dusičnanem	s Glyc + NaNO ₃	Očkovací poměr 1:10
8.	Médium dusičnanem	s Glyc + NaNO ₃ + 50 uL mikroelement roztoku	Očkovací poměr 1:10
9.	Médium dusičnanem	s Glyc + NaNO ₃	Očkovací poměr 1:20

			+ 50 uL mikroelement roztoku	
10.	Médium dusičnanem	s	2xGlyc + 2x NaNO ₃ + 100 uL mikroelement roztoku	Očkovací poměr 1:10
11.	Médium dusičnanem	s	2x Glyc + 2x NaNO ₃ + 100 uL mikroelement roztoku + 100 uL mikroelement roztoku	Očkovací poměr 1:20

První série optimalizačních testovacích experimentů byla založena tedy na **přidání mikroelementového roztoku** v množství 1 ml na litr média. Inokulační poměry byly zachovány stejné jako v případě předchozího experimentu.

Druhý set testovacích experimentů vycházel z výsledků prvního setu experimentů, kde bylo snížení množství inokulačních poměrů, kde jsme se zaměřili na **vyšší inokulační poměry vhodné pro průmysl a současně testovali různé přídavky mikroelementového roztoku do média**. Průběh a výsledky experimentu jsou zobrazeny níže.

V návaznosti na výsledky druhé kultivace s čistým glycerolem, kde bylo dosaženo nízké produkce biomasy z důvodu limitace živinami a zároveň se řešil vliv vysráženého media, kdy bylo pozorováno částečné vysrážení solí po sterilaci ve fermentoru, byl současně navržen postup **optimalizace použitého zdroje dusíku**. Na základě toho byl navržen experiment s různými zdroji dusíku – kromě močoviny byl přidán dusičnan draselný a síran amonný. Počet atomů dusíku zůstal v médiu zachován.

Tabulka 17: Složení média pro optimalizační kultivace

Voda	1000 ml
Odpadní glycerol*	30.00 g
KH ₂ PO ₄	4.00 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.696 g
Mikroelement roztok	1 ml
*Močovina	1.91 g
*Dusičnan draselný	5.12 g
*Síran amonný	4.00 g

*Jednotlivé zdroje dusíku byly použity dle tabulky 16

Tabulka 18: Design testovacího experimentu + produkce biomasy

	médium	složení	Očkovací poměr	Produkce biomasy g/l
1.	Kontrolní médium	Standardní složení	Očkovací poměr 1:5	19,22±2,38
2.	Kontrolní médium	Standardní složení	Očkovací poměr 1:10	19,18±1,78
3.	Kontrolní médium	2xGlyc + močovina	Očkovací poměr 1:5	17,06±2,64
4.	Kontrolní médium	2x Glyc + močovina	Očkovací poměr 1:10	16,15±1,78
5.	Kontrolní médium	Standardní složení	Očkovací poměr 1:20	19,24±1,53
Média s jiným zdrojem dusíku - dusičnan				
6.	Médium dusičnanem	s Glyc + KNO ₃	Očkovací poměr 1:5	17,06±2,03
7.	Médium dusičnanem	s Glyc + KNO ₃	Očkovací poměr 1:10	17,14±1,75
8.	Médium dusičnanem	s 2xGlyc + KNO ₃	Očkovací poměr 1:5	16,78±1,09
9.	Médium dusičnanem	s 2x Glyc + KNO ₃	Očkovací poměr 1:10	20,63±1,45
10.	Médium dusičnanem	s Glyc + KNO ₃	Očkovací poměr 1:20	17,81±1,38
Média s jiným zdrojem dusíku: dusičnan+ Síran amonný 50:50				
11.	Médium dusičnanem síranem	s a Glyc + KNO ₃ + síran amonný	Očkovací poměr 1:5	15,31±1,87

12.	Médium dusičnanem síranem	s a	Glyc + KNO ₃ + síran amonný	Očkovací poměr 1:10	13,06±1,64
13.	Médium dusičnanem síranem	s a	2x (Glyc + KNO ₃ + síran amonný)	Očkovací poměr 1:5	15,19±2,01
14.	Médium dusičnanem síranem	s a	2x (Glyc + KNO ₃ + síran amonný)	Očkovací poměr 1:10	13,38±1,78
15.	Médium dusičnanem síranem	s a	Glyc + KNO ₃ + síran amonný	Očkovací poměr 1:20	11,67±1,46
16.	Kontrolní médium		Standardní složení	Očkovací poměr 1:5	17,94±2,03

Ve třetím experimentu bylo navázáno na předchozí výsledky a opět byla **navýšena koncentrace mikroelementového roztoku**. Zároveň zde byly otestovány i různé kombinace zdrojů dusíku. Tento požadavek dále vzešel z výsledků druhé kultivace, kde po sterilaci docházelo k vysrážení části solí v médiu a mohlo tak dojít k omezení přístupu živin. Obecné složení média a jednotlivé variace baněk jsou zobrazeny v tabulkách níže:

Tabulka 19: Složení média pro další fázi optimalizace

Složka	Množství
Voda	1000 ml
Glycerol	92,50 g
KH ₂ PO ₄	8 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,392 g
NaNO ₃ 50 % dusíku	10,24 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ 50% dusíku	8 g
Mikroelementový roztok	3 ml
pH	6,5
Teplota	25°C

Tabulka 20: Kultivace v médiích s vyšším obsahem mikroelementového roztoku

	médium	složení	Očkovací poměr	Biomasa g/l
1.	= fermentor	dle tabulky	Očkovací poměr 1:100	2,8±1,1
2.	= fermentor	dle tabulky	Očkovací poměr 1:50	3,2±1,5
3.	Navýšený mikroelement	4 ml mikroelementu	Očkovací poměr 1:100	4,6±1,8
4.	Navýšený mikroelement	4 ml mikroelementu	Očkovací poměr 1:50	3,9±1,2
5.	Navýšený mikroelement	6 ml mikroelementu	Očkovací poměr 1:100	5,2±1,6
6.	Navýšený mikroelement	6 ml mikroelementu	Očkovací poměr 1:50	4,8±2,0
7,	Médium s vyšším fosforem	150 % P	Očkovací poměr 1:100	4,6±1,3
8,	Médium s vyšším fosforem	150 % P	Očkovací poměr 1:50	4,1±0,9
9,	Médium s vyšším fosforem	200 % P	Očkovací poměr 1:100	3,8±1,7
10,	Médium s vyšším fosforem	200 % P	Očkovací poměr 1:50	5,0±1,7
11,	Médium s vyšším hořčíkem	200 % Mg	Očkovací poměr 1:100	4,9±1,3
12,	Médium s vyšším hořčíkem	200 % Mg	Očkovací poměr 1:50	5,0±1,8

Na základě získaných experimentů bylo navrženo nové složení média, které bylo použito pro další, v pořadí. 3. kultivaci v Třeboni, která byla provedena v březnu 2022.

5.6. Březen 2022 – třetí velkoobjemová kultivace v Třeboni

Následně byla zahájena třetí kultivace, která navazuje na výsledky 2. velkoobjemové kultivace. V rámci výzkumu bylo optimalizováno složení média a médium bylo experimentálně obohaceno o mikroelementy (mikroprvky – zinek, železo, měď, mangan,...Tabulka 28). Následně bylo vzhledem k problému se srážením média po sterilaci nahrazen zdroj dusíku (původní močovina nahrazena dusičnanem). Celkové náklady na úpravu a obohacení média jsou max. v řádu několika stovek korun na 1000 L. Složení finálního média je uvedeno níže (Tabulka 21). Na základě třetí kultivace byly navrženy podmínky procesu pro průmyslovou produkci, které jsou uvedeny v dalším textu.

Optimalizované podmínky biotechnologického procesu, produkční a procesní parametry:

Na základě veškerých optimalizačních experimentů provedených v malých i velkých objemech **bylo opakovaně ověřeno a lze doporučit následující podmínky biotechnologického procesu** (pro 1000 l média):

Produkční kmen: *Rhodotorula toruloides* (Banno) CCY 0692-002-001

Složení médií a kultivace:

- 1) **Inokulace:** inokulační média I-IV (YPD) viz Tabulky 2 a 3; inokulační poměr 1:5; výsledný objem inokula 20 L do 1000 L tanku
- 2) **Produkce:** zaočkování produkčního média je třeba přidavkem 20 L inokula do 500 L produkčního média (optimalizované složení Tabulka 34); inokulační poměr se zvyšuje na 1:25
- 3) **Kultivace formou příkrmu – fed batch** – v optimální době přidavek druhé dávky 500 L produkčního média; kultivaci řídit pomocí pO₂ (množství rozpuštěného kyslíku)

Tabulka 21: Produkční médium pro velkoobjemovou kultivaci a podmínky (složení mikroelementového roztoku viz Tabulka 4)

Složka	Množství
Voda	1000 ml
Glycerol	92,50 g
KH ₂ PO ₄	8 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,392 g
NaNO ₃	10,12 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 g
Mikroelementový roztok	4 ml/l
pH	6,5
Teplota	25°C

Procesní parametry:

Nastaví se pH 6,5 a teplota kultivace 25°C, ostatní parametry striktně závisí na konstrukci průmyslového zařízení. Nejlepší forma kultivace je fed batch (redukce pění), případně vsádková kultivace. Kultivaci je nevhodnější řídit pomocí pO₂ (množství rozpuštěného kyslíku) tak, aby kultura měla dostatek kyslíku na oxidaci živin.

Tabulka 22: Charakterizace obohacené biomasy – 3 velkoobjemová kultivace

Název	Obsah účinné látky v 1 g biomasy [mg]
AMINOKYSELINY	
Methionin	2,9
Valin	8,9
Lysin	9
Isoleucin	7,5
Fenylalanin	7,3
Leucin	11,3
Threonin	7,5
Histidin	8,4
Arginin	7
Glutamát	18,9
Glycin	10,9
Alanin	11,1
Aspartát	13,1
Thyrosin	4
Prolin	7,8
Serin	8,2
aminokyseliny celkem	143,8
proteiny celkem	212,6
LIPIDY	
SFA	62
MUFA	120
PUFA	120
Lipidy celkem	302
SACHARIDY	
Betaglukany	105
Alfaglukany	98
Glukany celkem	203
MINERÁLY	
makroelementy	75
mikroelementy	0,84
MINORITNÍ METABOLITY	

Karotenoidy	1,4
Ergosterol	3,5
Ubichinon	2,1
B-komplex	0,12

Obvyklá produkce biomasy:

15 – 25 g/L; z 1000 L výtěžek obvykle kolem 20 kg lyofilizované nebo vysušené biomasy.

Stabilita: Hodnoty biologicky aktivních látek zůstávají beze změny nejméně po dobu 6 měsíců při uchování biomasy v suchém stavu, v chladu (4 – 8 °C) a tmě, ideálně s omezeným přístupem kyslíku.

6. Celková charakterizace produkované biomasy a využití

Biomasa karoteoidní kvasinky *Rhodotorula toruloides* může být naprodukována biotechnologicky s využitím odpadních substrátů jako zdroje živin. V případě prezentované technologie byl využit odpadní glycerol, jenž byl zhodnocen na produkci obohacené biomasy použitelné v řadě aplikací.

Doporučujeme používat biomasu v imortalizované formě, tedy před použitím zahřátou na 95 °C po dobu nejméně 10 min. Bylo opakovaně ověřeno, že v této podobě nedochází k významné ztrátě aktivních látek, biomasa není cytotoxická a je tedy pro další použití bezpečná.

Biomasa obsahuje hlavní cenné látky v průměrných množstvích uvedených v Tabulce 16. Jedná se o výtěžky z více kultivací uvedené jako průměrná rozmezí; poměry produkovaných metabolitů se mohou mírně lišit podle podmínek kultivace, konkrétního složení média (typ odpadního glycerolu) apod. Kromě těchto složek obsahuje biomasa speciální součásti uvedené v Tabulce 14, případně v Tabulce 22, které mohou mít dodatečné biologické účinky (manany – imunita; minerály - – nutná součást výživy, funkce specifických orgánů a enzymů; potravinové doplňky, farmacie; krmiva; vitaminy B komplexu - – imunita, výkonnost metabolismu; potravinové doplňky, farmacie; krmiva).

Přehled hlavních aktivních látek a jejich účinků, případně využití je dalším textu a v Tabulce 16, kde jsou uvedeny hodnoty v čerstvé i imortalizované biomase.

- **Proteiny** – zdroj výživy, zdroj esenciálních aminokyselin pro jedince se zvláštním výživovým režimem (sportovci, vegani); zdroj aminokyselin a výživy do krmiv
- **Lipidy** – zdroj energie, zdroj esenciálních mastných kyselin (cca 30% lipidů); potravinové doplňky, krmiva
- **Beta-glukany** – imunologicky aktivní látky s prokazatelným ochranným účinkem na imunitu; cca 17 %; potravinové doplňky, farmacie; krmiva
- **Karoteny** – provitaminy A, antioxidanty, imunologicky aktivní látky, přírodní UV filtry – obsah 7 – 10 mg/g; potravinové doplňky, farmacie; krmiva; kosmetika
- **Ergosterol** – provitamin D (osteoporóza, imunita) - potravinové doplňky, farmacie; krmiva

- **Ubichinon** – antioxidant, produkce buněčné energie; potravinové doplňky, farmacie; krmiva; kosmetika

Tabulka 16: Průměrné rozmezí obsahových látek v obohacené biomase *R.toruloides*

parametr	Živá biomasa	Imortalizovaná biomasa
Produkce suché biomasy (CDW, g/L)	21,2 – 31,5	21 - 31
Obsah bílkovin v sušině (mg/g)	250 - 338 25 % – 33,8 %	278 - 367 27,8 – 36,7 %
obsah lipidů v sušině (mg/g)	224 – 298 22,4 % – 29,8 %	243 – 349 24,3 % - 34,9 %
PUFA:MUFA:SFA (%)	8-14 :54-68 :24-32	-
Obsah beta-glukanů v sušině (mg/g)	168 – 177 16,8 % - 17,2 %	161 – 173 16,1 % - 17,3 %
Obsah alfa-glukanů v sušině (mg/g)	28 – 34 2,8 % - 3,4 %	28 – 34 2,8 % - 3,4 %
beta-karoten (mg/g suš.)	0,70 – 2,10	0,90 – 3,25
celkové karoteny (mg/g suš.)	6,12 – 7,21	8,07 – 10,42
torulen	4,81 – 5,82	4,98 – 6,08
torularhodin	0,17 – 0,21	0,22 – 0,30
ubichinon (mg/g suš.)	5,29 – 7,81	4,8 – 7,92
ergosterol (mg/g suš.)	2,52 – 3,95	2,18 – 2,47