

Bio

Ročník 33 • Číslo 4/2023

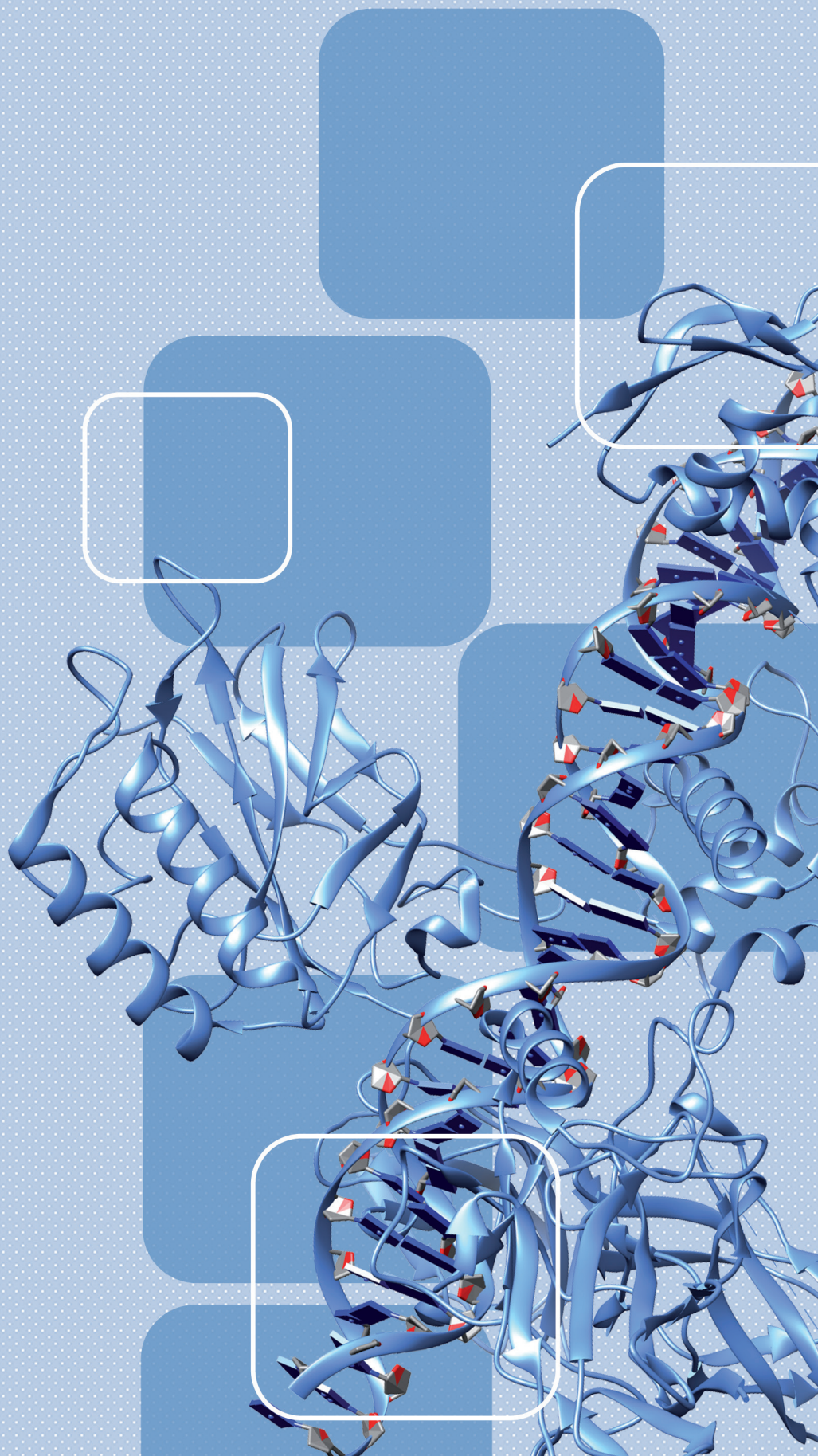
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: University of Chemistry and Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efbiotechnology.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)
UCT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

jako každoročně Vás v posledním čísle letošního Bioprospectu informujeme o průběhu valné hromady ČSVTS. Valná hromada velmi ocenila velice úspěšný rok, ve kterém se podařilo mimo jiné úspěšně realizovat Světový inženýrský konvent WEC 2023 pod předsednictvím ČSVTS a tehdejšího předsedy doc. Ing. Daniela Hanuse, CSc. Pro další období byl zvolen novým předsedou ČSVTS prof. RNDr. Pavel Drašar, DrSc. z České společnosti chemické, z.s. Za Biotechnologickou společnost, z.s. byl zvolen RNDr. Mgr. Tomáš Vaněk, CSc. do Dozorčí Rady ČSVTS. Aktuální informace lze získat na webových stránkách <http://zpravodaj.csvts.cz> a www.csvts.cz

Evropský biotechnologický kongres se bude konat od 30. června do 3. července 2024 v holandském Rotterdamu. Abstrakty je nutné zaslat do 12. dubna 2024.

Bližší informace o kongresu a dalších aktivitách EFB lze získat v listopadovém newsletter@efbiotechnology.org

Zajímavá výročí letošního roku:

190 let První strojní papírna v Rakousko-Uherské monarchii v pražské Bubenči

100 let českých aerolinií

ČSA byly založeny 6. října 1923 a patří do pěti nejstarších dosud existujících leteckých společností světa. Třicátá léta 20. století přinesla pro ČSA expanzi sítě linek do zahraničí. První mezinárodní linka Praha – Záhráb, jež byla v provozu od roku 1930. Tato linka byla již v roce 1933 prodloužena dále do Sušaku (dnešní Rijeka) a následně pak v roce 1936 do Splitu a Dubrovníku. Od roku 1933 byl zahájen rovněž provoz tzv. Rumunského expresu, což byla linka Praha – Užhorod – Kluž – Bukurešť. V roce 1936 bylo zavedeno letecké spojení ČSA s Kyjevem a Moskvou a o rok později pak s Bruselem. Ve stejném roce 1937 začíná provoz linky Praha – Bratislava – Klagenfurt – Terst – Benátky, v roce 1938 pak spojení do Paříže přes Štrasburk, jakož i do Říma. V roce 1937 začaly létat první letušky na linkách

ČSA a bylo zavedeno palubní občerstvení během letu. 1. ledna 1937 byl provoz ČSA převeden z letiště Praha – Kbely na nové letiště Praha – Ruzyně. Slibný rozkvět ČSA dočasně přerušil blížící se začátek 2. světové války. (Informace převzata od současných ČSA).

80 let Nemocnice v Motole

Zahájila provoz 4. 1. 1943

70 let Československá televize

Zahájila vysílání 1. 5. 1953. V r. 1973 pak vysílala i barevně.

40 let Barandovský most

30 let Samostatná Česká republika

30 let Museum vozového parku ve Střešovicích

20 let Muzeum Kampa

10 let Povodně v Praze

Nobelovy ceny

Konec listopadu je každoročně čas udělování Nobelových cen. Nás zajímá především udělení cen za fyziologii a lékařství, za fyziku a za chemii. Bohužel, jednoduché vysvětlení předmětů ocenění je prakticky nemožné a proto odkazujeme čtenáře našeho úvodníku na delší odborný výklad, který je dostupný na internetu.

Naši milí čtenáři,

přejeme Vám příjemné prožití vánočních svátků a po celý příští rok pevné zdraví a splnění všech Vašich přání a tužeb. Těšíme se na Vaši spolupráci při zajištění kvalitních článků v Bioprospectu i činnosti naší společnosti.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš, Petra Lipovová
a kolektiv redakce Bioprospectu

PCR A LAMP: UŽITEČNÉ NÁSTROJE PRO AUTENTIZACI RYB

Eliška Čermáková^{1,2}, Kamila Zdeňková¹

¹Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

²Výzkumný ústav potravinářský Praha, v. v. i.; fialovae@vscht.cz, kamila.zdenkova@vscht.cz

Úvod

Podvody s rybami a mořskými plody jsou celosvětovým problémem. Příkladem může být výsledek analýzy The Guardian Seascope, která ukázala, že více než 36 % mořských plodů a ryb zakoupených v restauracích, supermarketech nebo přímo od prodejců ryb ve více než 30 zemích bylo chybně označeno¹. Mezi nejběžnější typy podvodů s touto komoditou patří zejména záměna druhů, kdy se levnější rybí druh prodává jako dražší, nedodržení deklarované hmotnosti rybí svaloviny nebo nesprávné uvedení původu, což může mít vliv například na nutriční vlastnosti². Takové podvody mohou mít dalekosáhlé důsledky zahrnující i) zdravotní rizika (alergie, přítomnost těžkých kovů či toxinů) i finanční ztráty pro spotřebitele, ii) dopady na životní prostředí a iii) vznik ekologické nerovnováhy v ekosystémech v důsledku nadměrného rybolovu určitých druhů kvůli vysoké poptávce.

Při odhalování podvodů s rybami a mořskými plody mohou pomoci molekulárně-genetické metody, které díky analýze DNA umožňují spolehlivě určit prodáváný rybí druh i v případě tepelného opracování a/nebo ztráty morfologických znaků, jako je tomu například u rybích výrobků (pomazánky, saláty apod.)³⁻⁵. Nejrozšířenější metodou je pravděpodobně polymerázová řetězová reakce (PCR, angl. Polymerase Chain Reaction), která se v průběhu pandemie COVID-19 dostala i do povědomí široké veřejnosti. Známa je však tato metoda již od konce 20. století, a tak není překvapivé její široké spektrum využití^{6,7}.

Porovnání metody polymerázové řetězové reakce (PCR) a izotermické amplifikace zprostředkované smyčkou (LAMP)

PCR metoda umožňuje selektivní množení (amplifikaci) vybraného úseku nukleové kyseliny díky vhodné zvolenému páru primerů, tedy krátkých oligonukleoti-

dů komplementárních k cílové nukleotidové sekvenci přidávaných do reakční směsi. Reakce obvykle probíhá při třech teplotách, které se cyklicky opakují. Během nich dochází k denaturaci vlákna DNA, nasednutí primerů a syntéze nového, komplementárního vlákna. Vzniklé produkty amplifikace se tradičně detekují na agarosovém gelu po skončení PCR (tzv. end-point PCR). Novější formáty PCR, tedy PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase (qPCR) a digitální PCR (dPCR), umožňují detekci během amplifikace nebo po ní, pokročilé aplikace pak umožňují i kvantifikaci pomocí interkalačních barviv (např. SYBR Green®, EvaGreen®) nebo fluorescenčně značených sond^{6,8}. PCR všech formátů se běžně používají pro identifikaci živočišných druhů a byly úspěšně uplatněny při analýze složení potravin⁹⁻¹¹.

Méně známá je pak metoda izotermické amplifikace zprostředkované smyčkou (LAMP, angl. Loop-mediated isothermal amplification), která byla vyvinuta v roce 2000^{12,13}. Tato metoda využívá soubor čtyř až šesti primerů k amplifikaci vybraného úseku DNA, což vede ke vzniku lamplikonů různých délek v závislosti na počtu amplifikovaných jednotek cílové DNA spojených smyčkou. Reakce probíhá na rozdíl od PCR za konstantní teploty. Výsledky lze snadno interpretovat podle změny barvy reakční směsi nebo intenzity zákalu (turbidimetricky); kromě toho je možné detekovat produkty reakce na agarosovém gelu nebo sledovat nárůst fluorescenčního signálu v reálném čase obdobně jako u qPCR. Metoda našla rozsáhlé uplatnění v oblasti klinické diagnostiky, detekce geneticky modifikovaných organismů (GMO, angl. Genetically Modified Organisms) a také při autentizaci živočichů a rostlin. V posledních desetiletích byla LAMP metoda široce využívána také pro detekci mikroorganismů, včetně virů, které postihují rybí populace⁹. Pro identifikaci ryb samotných však začala být používána teprve nedávno. Porovnání metody PCR a LAMP je uvedeno v Tabulce I.

Tab. I: Srovnání vybraných parametrů metody PCR a LAMP

Parametr	Metoda	
	PCR	LAMP
Požadované množství DNA pro analýzu	≤ 100 ng	≤ 100 ng
Doporučená délka produktu	Obvykle 80 – 600 bp (dle formátu PCR)	Do 250 bp
Kapacita přístroje	Dáno termoblokem PCR cykleru (obvykle 96, možno až 384 jamek)	Dáno termoblokem PCR cykleru (obvykle 96, možno až 384 jamek) nebo kapacitou vodní lázně

Tab. I: (pokračování)

Parametr	Metoda	
	PCR	LAMP
Polymerasa	Termostabilní DNA polymerasa schopná zachovat si enzymovou aktivitu i za vysokých teplot ($\geq 90^\circ\text{C}$), např. <i>Taq</i> polymerasa, Klenowův fragment DNA-polymerasy I, T4 či T7 polymerasa	DNA polymerasa se schopností vytěsnění komplementárního řetězce DNA (angl. strand displacement activity), např. <i>Bst</i> nebo <i>Bsm</i> DNA polymerasa
Teplotní profil reakce	Střídání teplot, nejčastěji 95°C (denaturace), 60°C (nasednutí primerů) a 72°C (prodlužování vznikajícího řetězce, tzv. polymerace)	Izotermická (1 stálá teplota), nejčastěji při $60\text{--}65^\circ\text{C}$
Čas nezbytný pro analýzu (amplifikace DNA)	45 – 120 min	10 – 80 min
Možnost detekce amplikonu (vizualizace)	Fluorimetricky, elektroforeticky	Turbidimetricky, kolorimetricky, fluorimetricky, elektroforeticky
Možnost identifikace rybího druhu ve směsném vzorku	Ano	Ano
Možnost analýzy tepelně opracovaných vzorků (rybí produkty, pokrmy apod.)	Ano	Ano
Možnost multiplexní analýzy	Ano	Ano (detekce fluorescenčního signálu)
Potenciál pro mezilaboratorní reprodukovatelnost	Vysoký	Střední
Potenciál pro tvorbu databází	Vysoký (sekvence a délky specifických produktů)	Ne (tvorba smyček)

Uplatnění PCR a LAMP při identifikaci vybraných rybích druhů dostupných na českém trhu

Zatímco metoda PCR je pro identifikaci rybích druhů využívána již dlouhá léta, metoda LAMP je za tímto účelem využívána především v posledních letech. V aktuálně dostupných publikacích je tak dosud možné dohledat metodiku LAMP pouze pro úzké spektrum rybích druhů. Pokud je nám známo, použití LAMP pro identifikaci ryb bylo publikováno pouze pro vybrané druhy lososa^{14,15}, pstruha¹⁶, tuňáka^{17,18}, úhoře¹⁹, tresky²⁰, jazyka²¹, a zástupce rodu *Arothron* nebo *Diodon*^{22,23}. Přehledová Tabulka II proto neobsahuje seznam všech ryb, pro něž byla vyvinuta metoda PCR, ale vychází z dostupných protokolů pro identifikaci rybích druhů prostřednictvím metody LAMP. Zahrnuty byly také 4 rybí druhy běžně dostupné na českém trhu a/nebo s vysokou mírou rizika falšování, pro které metoda

LAMP dosud neexistuje. Obsáhlý přehled využití PCR metody, ale i dalších molekulárně-biologických metod, pro druhovou identifikaci ryb a odhalování jejich falšování byl publikován například v práci 9 nebo 24.

Ačkoliv je metoda LAMP obecně prezentována jako citlivější přístup než PCR²⁵, publikované výsledky toto jednoznačně nepotvrdily. Například 10 porovnali metody LAMP a PCR při analýze DNA lososa obecného; stanovená citlivost PCR testu byla 10x vyšší než u metody LAMP. Naopak lze na základě dostupných výsledků jednoznačně říct, že metoda LAMP může významně urychlit rychlost reakce. Přímá detekce lamplikonů s využitím barviva SYBR Green zkrátila čas analýzy na méně než 30 minut. To může být užitečné především při analýze vzorků za účelem kontroly trhu s potravinami, neboť to umožní rychlé varování v případě zjištění falšování či kontaminace vzorku.

Problematikou falšování ryb a možnostmi identifikace rybích druhů s využitím metody LAMP se zabýval

také workshop „Falšování ryb: aktuální trendy a metody odhalování“, který se konal 1. 12. 2023 na VŠCHT Praha. Posluchači se mohli dozvědět více o diverzitě

ryb lovených v ČR, možných komplikací při odhalování falšování u zpracovaných produktů rybolovu i využívaných metodách.

Tab. II: Stručný přehled prací publikovaných pro DNA identifikaci rybích druhů s využitím metod LAMP a PCR. Výběr ryb byl volen na základě dostupných metodik pro metodu LAMP, významnost pro český trh a/nebo vysokou míru jejich falšování.

Rybí druh	Metoda detekce a cílový fragment DNA		Reference
	PCR	LAMP	
Jazyk obecný (<i>Solea solea</i>)	5S rDNA; ITS 1	<i>cytb</i>	21; 26; 27
Losos obecný (<i>Salmo salar</i>)	<i>coi</i> , <i>cytb</i>	<i>cytb</i>	14; 28; 29; 30; 31
Pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>coi</i> , <i>cytb</i>	<i>cytb</i>	29; 30; 16
Treska obecná (<i>Gadus morhua</i>)	<i>cytb</i> , <i>coi</i>	<i>cytb</i>	20; 32; 33; 34
Treska velkohlavá (<i>G. macrocephalus</i>)	12S rRNA; nekódující úseky DNA (barcoding)	<i>cytb</i>	32; 33; 35; 36
Treska skvrnitá (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>)	12S rRNA	<i>cytb</i>	32; 35
Treska pestrá (<i>Theragra chalcogramma</i>)	<i>PanI</i>	<i>cytb</i>	33; 37
Tuňák pruhovaný (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	<i>cytb</i>	<i>cytb</i>	17; 38; 39
Tuňák žlutoploutvý (<i>Thunnus albacares</i>)	<i>coxII</i> , NADH2; NADH4; 12S rRNA	<i>cytb</i>	18; 39
Úhoř říční (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>cytb</i> **	Lektin typ-C	19; 40
Rod <i>Arothron</i>	16S rRNA**	<i>coi</i>	22; 41
Rod <i>Diodon</i>	–	<i>coi</i>	23
Řas mořský* (<i>Lophius piscatorius</i>)	parvalbumin	–	42
Mořan tmavý* (<i>Spondyliosoma cantharus</i>)	parvalbumin	–	43
Kapr obecný# (<i>Cyprinus carpio</i>)	D-loop	–	44
Makrela obecná€ (<i>Scomber scombrus</i>)	<i>cytb</i>	–	45

*Ryby z rodu *Lophius* jsou komerčně velmi ceněné. Řas mořský je často využíván jako náhražka řasy černobřiché (L. *budegassa*), který je u konzumentů oblíbenější.

*Mořan tmavý, neboli pražma tmavá, je u konzumentů oblíbený pro své lahodné bílé maso. Pražmy jsou běžně prodávány v obchodních řetězcích ČR. Obvykle je však v obchodech dostupná pražma královská, která je dražší.

#Kapr obecný byl zahrnut do tabulky jako tradiční česká ryba.

€Makrela obecná je velmi oblíbená u spotřebitelů. Bylo však zaznamenáno několik případů falšování, kdy makrela obecná byla zaměněna za jiný druh makrel.

**Detekční metodou bylo PCR-RFLP a/nebo PCR-SSCP, nikoliv samotné PCR.

Závěr:

Ryby a rybí výrobky patří mezi cenné a často obchodované komodity, což je předurčuje k falšování. Nahrazení kvalitní nebo vzácné ryby méně hodnotným druhem je, bohužel, častým problémem. Takové nahrazení mohou ohrozit zdraví spotřebitele, protože ryby jsou jedním z hlavních zdrojů alergenů, jejichž obsah se u jednotlivých druhů liší. Proto je klíčové mít k dispozici spolehlivý a rychlý systém pro kontrolu ryb a rybích výrobků na trhu. Metoda LAMP se jeví jako slibný nástroj pro identifikaci rybích druhů díky své rychlosti, vysoké specifičnosti a jednoduchosti použití. Navíc ne-

potřebuje nákladné laboratorní vybavení, což umožňuje provádět rutinní analýzy s vyšší efektivitou. V této práci prezentujeme schopnost metody LAMP rozlišovat různé druhy ryb a porovnáváme ji s PCR, která je nejběžnější molekulárně-biologickou metodou pro detekci a identifikaci rybích druhů.

Poděkování:

Práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství České republiky, grantem číslo QK1910231 a institucionální podporou MZE-RO0323.

Literatura:

1. Leahy S: *The Guardian* (2021).
2. Reilly A: *FAO Fisheries and Aquaculture Circular* (C1165), 1-21 (2018).
3. Aksun Tümerkan ET: *Molecules* 27(17), 5674 (2022).
4. Mata W, Chanmalee T, et al.: *Food Control* 108, 106842 (2020).
5. Hafsa AB, Nabi N, et al.: *Food chemistry* 190, 1040 (2016).
6. Fialová E, Zdeňková K, et al.: *Chemické listy* 113(9), 545 (2019).
7. Fialová E, Zdeňková K, et al.: *Bioprospect* 4, 91 (2017).
8. Zhu H, Zhang H, et al.: *Biotechniques* 69(4), 317 (2020).
9. Cermakova E, Lencova S, et al.: *Foods* 12(1), 228 (2023).
10. BöHme K, Calo-Mata P, et al.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(14), 3854 (2019).
11. Burns M, Foster L, et al.: DNA techniques to verify food authenticity: applications in food fraud, Royal Society of Chemistry (2019).
12. Notomi T, Okayama H, et al.: *Nucleic acids research* 28(12), e63 (2000).
13. Lencová S, Zdeňková K, et al.: *Chemické listy* 113(5), 292 (2019).
14. Xiong X, Huang M, et al.: *Food Analytical Methods* 13(6), 1235 (2020).
15. Xiong X, Huang M, et al.: *Journal of Food Composition and Analysis* 95, 103659 (2021).
16. Xiong X, Huang M, et al.: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100(13), 4696 (2020).
17. Xiong X, Xu W, et al.: *Journal of Food Composition and Analysis* 102, 104038 (2021).
18. Ali A, Kreitlow A, et al.: *PloS one* 17(10), e0275452 (2022).
19. Spielmann G, Ziegler S, et al.: *Food Control* 101, 156 (2019).
20. Saull J, Duggan C, et al.: *Food Control* 59, 306 (2016).
21. Deconinck D, Robbins J, et al.: *Journal of Food Composition and Analysis* 118, 105166 (2023).
22. Xie R, Gao J, et al.: *Journal of Food Composition and Analysis* 111, 104631 (2022).
23. Xie R, Gao J, et al.: *Food Analytical Methods* 15(9), 2487 (2022).
24. Kotsanopoulos KV, Exadactylos A, et al.: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20(2), 1584 (2021).
25. Sheu S-C, Tsou P-C, et al.: *Food chemistry* 257, 67-74 (2018).
26. Céspedes A, García T, et al.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(3), 1046 (1999).
27. Herrero B, Lago FC, et al.: *Food Additives & Contaminants: Part A* 29(1), 12 (2012).
28. Li Q, Cheng Y, et al.: *Journal of Food Composition and Analysis* 105, 104224 (2022).
29. Li Q, Xue H, et al.: *Food Chemistry: Molecular Sciences* 4, 100107 (2022).
30. Xu W, Fu M, et al.: *Journal of Food Composition and Analysis* 97, 103765 (2021).
31. Herrero B, Vieites JM, et al.: *Food Chem* 127 (2011).
32. Wang Y, Feng J, et al.: *Molecular and cellular probes* 47, 101420 (2019).
33. Li H, Xie R, et al.: *Aquaculture* 545, 737209 (2021).
34. Herrero B, Madrinan M, et al.: *Journal of agricultural and food chemistry* 58(8), 4794 (2010).
35. Shi R, Xiong X, et al.: *European Food Research and Technology* 246(5), 891 (2020).
36. Paracchini V, Petrillo M, et al.: *Food Control* 79, 297 (2017).
37. Hubalkova Z, Kralik P, et al.: *Journal of agricultural and food chemistry* 56(10), 3454 (2008).
38. Rehbein H, Mackie IM, et al.: *Food Chemistry* 64(2), 263 (1999).
39. Lee G-Y, Suh S-M, et al.: *Foods* 11(3), 280 (2022).
40. Rehbein H, Sotelo CG, et al.: *European Food Research and Technology* 214(2), 171 (2002).
41. Ishizaki S, Yokoyama Y, et al.: *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 1(1), 139 (2006).
42. Mukherjee S, Hanak P, et al.: *Journal of Food Composition and Analysis* 115, 104992 (2023).
43. Akhatova D, Laknerova I, et al.: *Journal of Food & Nutrition Research* 57(1), (2018).
44. Bajzik P, Golian J, et al.: *Żywność Nauka Technologia Jakość* 19(5), (2012).
45. Velasco A, Sánchez A, et al.: *Food chemistry* 141(3), 2006 (2013).

Souhrn

Čermáková E., Zdeňková K.: PCR a LAMP: užitečné nástroje pro autentizaci ryb

Ověřování pravosti a odhalování nesprávného označování potravin má pro ochranu spotřebitelů velký význam již po staletí. Na kontroli kvality potravin se tak zaměřují výzkumné laboratoře i kontrolní orgány. Europol, organizace zabývající se prevencí a potíráním organizované trestné činnosti, se v nedávné době zaměřil na odhalení falšovaných potravin v Evropské unii. Během prosince 2021 – května 2022 zabavil téměř 27 000 tun falšovaných potravin z 26 zemí. Mezi často falšované komodity patří ryby a rybí produkty. Pro podvodníky se ryby stávají snadným cílem, neboť i jednoduché procesy zpracování, jako je filetování, odstraňují velmi důležité morfologické znaky a znemožňují tak vizuální identifikaci rybích druhů v produktech uváděných na trh. Proto byly vyvinuty techniky umožňující identifikaci druhů i ve zpracované rybí svalovině a rybích výrobcích. Předkládaná práce si klade za cíl porovnat dvě z nich: polymerázovou řetězovou reakci, která je významnou a dnes již běžně využívanou molekulární metodou pro ověřování pravosti potravin, a metodu izotermické amplifikace zprostředkované smyčkou, která se pro identifikaci rybích druhů využívá teprve pár let. Text shrnuje základní parametry obou metod a také jejich uplatnění při identifikaci rybích druhů.

Klíčová slova

autentizace potravin, DNA analýza, druhová identifikace, falšování ryb, rybí druhy

Summary

Čermáková E., Zdeňková K.: PCR and LAMP: useful tools for authenticating fish

Verifying the authenticity and detecting mislabelling of food has been of great importance for centuries. Thus, research laboratories and controlling authority focus on food quality control. Between December 2021 and May 2022, an EU-wide action was carried out to detect counterfeit food. Europol seized almost 27,000 tonnes of fraudulent food from 26 countries. Fish and fish products are among the most frequently adulterated commodities. Fish is an easy target for fraudsters, as even simple processing processes such as filleting remove very important morphological features, making it impossible to visually identify the fish species in marketed products. Analytical techniques have therefore been developed to allow species identification even in processed fish muscle and fish products. The present work aims to compare two of them: the polymerase chain reaction, an important and nowadays commonly used molecular method for authentication of foodstuffs, and the loop-mediated isothermal amplification method, which has only been used for the identification of fish species for a few years. The text summarises the basic parameters of both methods and their application in fish species identification.

Keywords

food authentication, DNA analysis, species identification, fish fraud, fish species

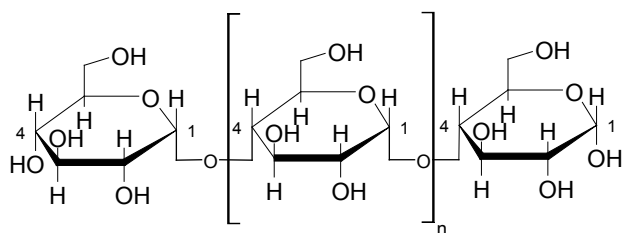
ŠKROB – BIOSYNTÉZA, NUTRIČNÍ VLASTNOSTI, BIOTECHNOLOGIE, ENZYMOVÉ METODY STANOVENÍ JEDNOTLIVÝCH FOREM ŠKROBU

Evžen Šárka, Petra Smrčková

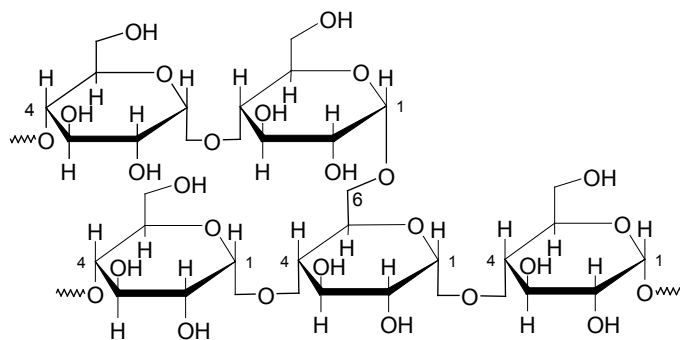
Ústav sacharidů a cereálií, Fakulta potravinářské a biochemické technologie,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; evzen.sarka@vscht.cz

Úvod

Škrob je biopolymer, jehož hlavními složkami jsou dva α -D-glukany – lineární amylosa s α -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidovými vazbami (Obr. 1) a větvený amylopektin, obsahující α -(1 $\rightarrow$ 4) a α -(1 $\rightarrow$ 6) vazby. U amylopektinu dochází k větvení α -(1 $\rightarrow$ 6) po 10 až 100 anhydroglukosových jednotkách (Obr. 2). Molekula obsahuje místa s větší koncentrací hmoty, která jsou krystalická (vytvářejí se tzv. klastry), a méně „husté“ vrstvy, které mají amorfni charakter.



Obr. 1: Strukturní vzorec amylosy



Obr. 2: Strukturní vzorec amylopektinu

či voskové kukuřice obsahuje jen asi 1 – 8 % amylosy, u amyloječmenu a amylokukuřice 60 – 70 % amylosy, škrob z GM brambor může obsahovat 98 % amylopektinu.

Celosvětová produkce škrobu se v roce 2020 odhadovala na asi 90 milionů tun. Z tohoto celkového množství pochází 75 % z kukuřice, následuje tapioka/maniok (14 %), pšenice (7 %) a brambory (4 %). V Evropské unii se v současnosti vyrobí asi 11 mil. t škrobu.

Kromě vysoké produkce je zajímavá i dlouhá historie produkce škrobu a jeho využití. Již ve starém Egyptě (3500 př. Kr.) byl získáván z pšeničných zrn a sloužil k zasypávání ran, ke kosmetickým účelům (pudrování), ke slepování pruhů papýru a k vyhlazování jeho povrchu. Od doby Mezopotámie a starého Egypta byl využíván naklíčený ječmen obsahující hydrolyzovaný škrob k následnému zpracování v kvasných procesech^{1,2}. Podobně se škrob podílí i na fermentaci těsta při přípravě chleba, jehož historie je rovněž velmi dávná. O selské výrobě izolovaného škrobu první písemnou zmínku napsal Cato (234 – 149 př. Kr.) ve spise *O zemědělství*.

Ve 14. století bylo známo použití škrobu ke škrobení prádla. V roce 1739 byla v Anglii povolena výroba bramborového škrobu, aby se uchovalo obilí pro potraviny v souvislosti s válkou se Španělskem. Gotlieb Kirchoff v r. 1811 popsal výrobu škrobového sirupu pomocí kyseliny sírové, Justus von Liebig (1829) působil na škrob chlórem a zjistil u oxidovaného škrobu značnou změnu vlastností³.

Zásadní zlom nastal ve 20. století po vývoji technologicky použitelných enzymů ke zpracování škrobu, což umožnilo jeho širší využití především v nápojovém průmyslu. Byly zpracovány technologie pro různé sirupy na bázi škrobu (glukosové, maltosové či glukoso-fruktosové). Tyto biochemické procesy produkují chuťově příjemnější hydrolyzáty v porovnání s těmi získanými kyselou hydrolyzou, mimo to jejich výroba je ekonomicky výhodnější.

Biosyntéza a hydrolyza škrobu v rostlinách

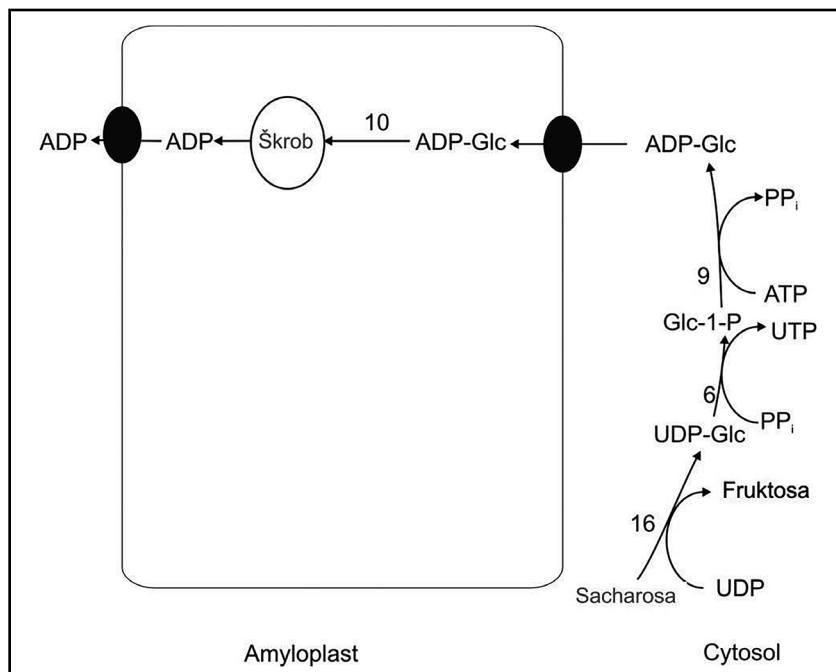
Škrob vzniká při fotosyntéze v chloroplastech listů zelených rostlin jako metabolický produkt, do kterého se ukládá světelná energie přeměněná na energii chemickou. Z chloroplastů je tento přechodně uložený škrob degradován na rozpustné sacharidy a je dále transportován ve formě jednoduchých látek do zásobních orgánů rostlin (hlízy, oddenky, plody atd.), kde je opět syntetizován škrob, který se ukládá v podobě škrobových zrn ve zvláštních organelách, leukoplastech, které se podle funkce nazývají amyloplasty.

První fáze syntézy škrobu předpokládá vznik celé řady meziproduktů, jako jsou fruktosa-6-fosfát, fruktosabifosfát, glu-

kosa-1-fosfát; glukosa-6-fosfát, sacharosa a adenosin difosfoglukosa. Ve tmavé fázi dochází k opačnému sledu reakcí, přičemž meziproduktem je sacharosa, jejíž roztok umožňuje další transport. Opětná syntéza škrobu v zásobním orgánu rostliny probíhá rovněž v několika krocích, které se liší pro jednoděložné (Obr. 3) a dvojděložné rostliny. Meziprodukt adenosin difosfoglukosa je důležitým meziproduktem, který je vytvářen podle druhu rostliny buď v cytosolu nebo uvnitř amyloplasty⁴.

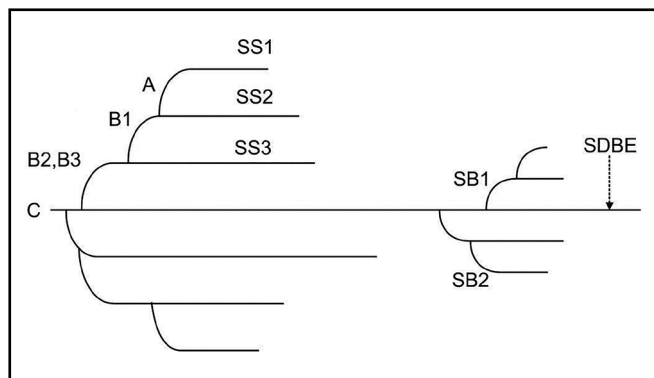
V uvedeném schématu je konečná fáze tvorby amylosy a amylopektinu zobrazena zjednodušeně. Detailněji je tento krok přiblížen na Obr. 4. GBSS I (granule-bound starch synthase, waxy protein) je jedinou škrobovou syntasou pro syntézu amylosy v cereálním endospermu, řídí ale také syntézu dlouhých řetězců amylopektinu. Pokud jde o amylopektin, podílí se na jeho stavbě několik enzymů: škrobová syntasa SS1 – katalyzuje syntézu řetězců amylopektinu se stupněm polymerace (DP) z 6 – 7 na DP 8 – 12, SS2 syntézu řetězců z 6 – 10 na 12 – 25, SS3 syntézu řetězců o DP 25 – 35 nebo delších, SS4 řídí vznik škrobových zrn. Kromě toho zde působí větvičí enzymy SB1 a SB2 (starch branching enzyme) a „opravující“ odvětovací enzym SDBE (starch debranching enzyme).

Obrácený proces temné fáze můžeme sledovat při zmrznutí brambor, přesněji při uskladnění za nízké teploty. Vzniká nepříjemně sladká chuť, na níž mají hlavní podíl sacharosa, maltosa a nízkomolekulární dextriny. V tomto biochemickém procesu kromě částečně obráceného procesu oproti biosyntéze škrobu působí ještě i další enzymy⁵.



Obr. 3: Proces syntézy škrobu v heterotrofních orgánech jednoděložných rostlin (např. obilovin) podle Bahaji et al.⁴;

význam symbolů: ADP – adenosindifosfát, ATP adenosin trifosfát, ADP-Glc adenosin difosfoglukosa, Glc-1-P glukosa-1-fosfát, UDP uridin difosfát, UDP-Glc uridin difosfoglukosa, UTP uridin trifosfát, PP_i anorganické fosforečnany; enzymy: 6 UDP-Glc pyrofosforylasa, 9 adenosin difosfoglukosa pyrofosforylasa, 10 škrobová syntasa, 16 sacharosová syntasa



Obr. 4: Biosyntéza amylopektinu

(A, B1, B2, B3, C – anhydroglukosové řetězce v molekule amylopektinu vázané vazbou α -D-(1 $\rightarrow$ 4), rozvětvení znázorňuje anhydroglukosovou jednotku s vazbou α -D-(1 $\rightarrow$ 6): A – krátké, dále nerozvětvené řetězce, B1 – krátké, dále rozvětvené řetězce, B2 – řetězce zasahující 2 klastry, B3 – řetězce zasahující 3 klastry, C – řetězec obsahující redukující konec; SS1 až SS3 – škrobové syntasy, SB1 a SB2 – větvicí enzymy, SDBE – odvětovací enzym)

Genetickou modifikací lze ovlivnit jednotlivé biochemické cesty biosyntézy škrobu. V poslední době byly testovány postupy, kterými lze ovlivnit velikost škrobových zrn, obsah amylosy či obsah fosfatů⁶.

Sled chemických reakcí lze pomocí GM upravit i tak, že výsledným produktem fotosyntézy jsou fruktany. Rostlinné fruktany jsou využívány pro řadu potravinářských i nepotravinářských aplikací v závislosti na stupni polymerace. Inulin s krátkými řetězci může být využit k výrobě fruktosových sirupů. Inulin s dlouhými řetězci (DP $\geq$ 25) se využívá jako náhražka tuku, prebiotikum a stabilizátor pěny v potravinách⁷.

Stravitelnost škrobu

V lidském organismu se na zpracování sacharidů podílejí především následující enzymy: α -amylasa hydrolyzující vazby α -D-(1 $\rightarrow$ 4) (EC 3.2.1.1; pankreatická amylasa a amylasa ve slinách), β -D-fruktofuranosidasa (sacharasa) (EC 3.2.1.26), α -D-glukosidasa (EC 3.2.1.20) a β -D-galaktosidasa (EC 3.2.1.23). Kromě toho působí v žaludku kyselina chlorovodíková a ve střevě žlučové kyseliny. Na rozdíl od hydrolýzy amylosy, která je náhodně štěpena na maltooligosacharidy, působení α -amylasy na amylopektin není náhodné: jeho výslednými produkty jsou maltosa, maltotriosa a větvené α -hraniční dextriny obsahující všechny původní vazby α -D-(1 $\rightarrow$ 6) a sousední vazby α -D-(1 $\rightarrow$ 4). Amylosa je trávena pomaleji a v menší míře než amylopektin. Bylo prokázáno, že glykemická odezva amylosy je menší než u stejného množství amylopektinu.

Stravitelnost škrobu je ovlivněna tvorbou komplexů s lipidy a proteiny. Kromě toho se má za to, že se fenolické sloučeniny vážou na aktivní nebo sekundární místa trávicích enzymů a/nebo na škrob, čímž snižují jeho hydrolýzu⁸. Roli hraje i inkorporace škrobu do buněčných stěn či podíl škrobové složky s vyšší krystalinitou.

Z hlediska stravitelnosti lze škrob rozdělit do následujících kategorií:

- 1) Rychle stravitelný škrob (RDS – rapidly digestible starch), který je v trávicím traktu zcela hydrolyzován do 20 min od prvního kontaktu s trávicími enzymy⁹. Způsobuje rychlý nárůst hladiny glukosy v krvi s následným rychlým poklesem. V potravinách se RDS sestává hlavně z dispergovaného a amorfního škrobu, který se nachází ve velkém množství v čerstvě uvařených potravinách.
 - 2) Pomalu stravitelný škrob (SDS – slowly digestible starch) je zcela hydrolyzován na glukosu během 20 – 120 min. Glukosa se do krve uvolňuje postupně, a proto je její hladina v krvi po určitou dobu téměř konstantní. Tím se zlepšuje jak fyzická, tak duševní výkonnost organismu a prodlužuje se pocit nasycení. Struktura SDS je částečně krystalická, přirozeně se vyskytuje v potravinách částečně tepelně upravených, jako jsou snídaňové cereálie, luštěniny a v nativních vysokoamylosové škroboch.
 - 3) Rezistentní škroby (RS) procházejí tenkým střevem nestrávené až do tlustého střeva, kde jsou rozloženy fermentací až na mastné kyseliny, oxid uhličitý, vodík a metan. Struktura RS je převážně krystalická, v potravinách se vyskytuje přirozeně např. v banánech, syrových bramborách a uloženém chlebu.
- Jednou z funkcí rezistentního škrobu (s výjimkou některých zvlášť odolných rezistentních škrobů) je jeho fermentace mikroorganismy v tlustém střevě na monokarboxylové kyseliny s krátkým alifatickým řetězcem (short chain fatty acids – SCFAs). Tyto kyseliny jsou známy jako hlavní nutrient epiteliálních buněk tlustého střeva, a nedostatek butyrátů zvyšuje riziko rakoviny. SCFAs mají také pozitivní efekt na zlepšenou absorpci hořčíku a vápníku, pravděpodobně díky jejich vyšší rozpustnosti v kyselejším prostředí. Mají rovněž příznivý vliv na rovnováhu bakteriálních druhů, tzn. především bifidobakterií a laktobacilů, které zamezují rozvoji patogenních bakterií; toto se projevuje zlepšením bakteriálního metabolismu solí žlučových kyselin. Metabolismus SCFAs může přispívat ke zlepšení kontroly glykémie a zlepšení metabolismu lipidů u diabetiků, což souvisí s tím, že rezistentní škrob snižuje postprandiální glukosovou a insulinovou odezvu¹⁰.
- Rezistentní škrob lze rozdělit na 5 následujících typů:
- RS1 – fyzikálně nedostupný škrob, nalézá se v celých obilných zrnech a luštěninách. Škrob tohoto typu je začleněn do buněčné struktury potravin, a ta brání přístupu enzymů. Tepelným zahřevem však dojde k rozrušení struktury, a škrob se tak stává stravitelným.
 - RS2 – V nativních zrnech jsou přítomny krystalické struktury škrobu, které se však po působení tepelného zahřevu stávají přístupnější pro trávicí enzymy. RS2 můžeme nalézt v syrových bramborách, luštěninách nebo banánech.
 - RS3 – retrogradovaný škrob, např. ve vařených a zchlazených bramborách, chlebové kůrce, kukuřičných vločkách. Např. Jurkaninová et al.¹¹ zjistili, že obsah rezistentního škrobu v knedlíkách se zvyšoval s dobou jejich uložení při snížené teplotě (asi 5 °C). Shi et al.¹² připravili RS3 zpracováním hrachových škrobů se svraskalým povrchem (obsah amylosy 79,5 % – 94,4 %) s ky-

selinou, zmazováním, odvětvením (debranching) amylopektinu a rekrystalizací; poté byla struktura dále modifikována tepelně-vlhkým zpracováním (heat moisture treatment). RS3 po ošetření tlakovým ohřevem s 30% vlhkostí vykazoval nejvyšší obsah RS (84,7 %).

RS4 – Škrob chemicky modifikovaný se liší od ostatních typů tím, že jeho struktura je buď zesíťovaná, nebo obsahuje esterové či etherové vazby. Tyto modifikace výrazně mění vlastnosti škrobu, které jsou poté využívány v různých odvětvích průmyslu¹³.

RS5 – je tvořen amyloso-lipidovými komplexy. Asociované spirálové molekuly amylosy tvoří inkusní sloučeniny s lipidy. RS5 se zpravidla tvoří až po zahřátí směsi nad 90 °C a je tepelně odolný¹⁴.

Obsah rezistentního škrobu je vysoký zejména v luštěninách a škrobech izolovaných z nich. Např. Smrčková et al.¹⁵ zjistili u škrobů s vysokým obsahem amylosy – u hrachového škrobu Radovan (obsah amylosy 88,1 %) a škrobu z červených fazolí (obsah amylosy 79,3 %) – hodnoty RS v rozmezí 15–20 % škrobu oproti RS 2–5 % škrobu při nižším obsahu amylosy u škrobu ze žlutého hrachu s obsahem amylosy 36,5 % nebo z fazolí mungo s obsahem amylosy 33,8 %. Po tepelném zpracování luštěninového škrobu s vysokým obsahem rezistentního škrobu jeho obsah klesá, naopak u luštěnin s nižším obsahem rezistentního škrobu dochází k jeho vysokému nárůstu po tepelné úpravě (např. u fazolu obecného až na 32,3 % suš.), což souvisí s retrogradací amylosy, na kterou je luštěninový škrob bohatší¹⁰.

Enzymové metody stanovení rychle a pomalu stravitelného a škrobu rezistentního jsou pojednány v následujících kapitolách.

Biotechnologie na bázi škrobu

Průmyslově nejvýznamnějšími jsou výroby hydrolyzátů škrobu. Může jít o částečně hydrolyzovaný škrob (maltodextriny), různé sirupy na bázi škrobu, ty mohou být následně usušeny nebo podrobeny krystalizaci. U enzymového zpracování škrobu se využívají potravinářské enzymy jako je α -amylasa, β -amylasa, amyloglukosidasa, pullulanasa či glukosaisomerasa.

Maltodextriny se vyrábějí ze škrobu v hydratovaném (zmazovatělem) stavu, na který působí termostabilní α -amylasa při optimální teplotě a pH. Konečným výrobkem je usušený práškový produkt. Kromě sušiny se charakterizuje tzv. dextrosovým ekvivalentem (DE), jehož hodnota je nižší než 20. Jsou součástí tekuté výživy při metabolických poruchách organismu (např. při vyšším stupni celiakie). Lze jimi nahrazovat tuk ve výrobku, dále se např. využívají jako stabilizátory a vodoravné prostředky kysaných mléčných výrobků.

Zjednodušené technologické schéma výroby tekutých hydrolyzátů škrobu je na Obr. 5. K hydrolyze se používá disperze škrobu o koncentraci 30–35 %. Její pH se upraví na optimální podmínky působení ztekucujícího enzymu (termostabilní α -amylasy). α -amylasa (EC 3.2.1.1) štěpí vazbu α -D-(1 → 4). Ztekucení, při kterém dochází ke snížení viskozity disperze, se realizuje

po zahřátí v tryskovém vařáku na teplotu asi 110 °C, v této fázi se přidává enzym, výsledné DE meziproductu po 10–90 min se pohybuje v rozmezí 10–12.

Ve druhém stupni je prováděno tzv. zcukření pomocí β -amylasy nebo amyloglukosidasy, tj. probíhá zde hlavní část vlastní hydrolyzy. β -amylasy též štěpí vazbu α -D-(1 → 4), přičemž odštěpují maltosové jednotky od neredukujícího konce řetězce; amyloglukosidasa (EC 3.2.1.3) hydrolyzuje vazby α -D-(1 → 4) i α -D-(1 → 6), přičemž vazba α -D-(1 → 6) se štěpí pomaleji, hydrolyza probíhá od neredukujícího konce řetězce po jedné glukosové jednotce¹⁶. Ve většině případů musí být nejprve ztekucující enzym inaktivován, což se obvykle provádí úpravou teploty a snížením pH. Na rozdíl od prvního stupně vyžaduje zcukření podstatně delší dobu, a to 6–96 h. Provádí se ve vysokoobjemových temperovaných míchaných nádobách a podle druhu zcukřujícího enzymu je nutné dodržet optimální podmínky působení enzymu, tj. teplotu, pH a dávkování. Po dosažení požadovaného stupně zcukření je provedena inaktivace enzymu pasterací hydrolyzátu.

Následuje vícestupňová filtrace na ionexových filtrech, filtrace s adsorpcí na aktivním uhlí na svíčkovém tlakovém filtru, a odpařování za sníženého tlaku na konečnou sušinu 70–83 %. Konečný DE má obvykle hodnotu v rozmezí 38–48.

Technologie je často doplněna enzymy, které štěpí pšeničnou bílkovinu na aminokyseliny, takže tyto hydrolyzáty lze využít i pro bezlepkovou stravu.

V případě glukosofruktosových sirupů technologie pokračuje isomerizací glukosy; následné procesy rafinace a odpaření jsou realizovány podobně jako v předchozím případě. Vzniklý produkt označovaný jako isoglukosa či glukoso-fruktosový sirup, označovaný též jako HFC či HFCS, má sladkost prakticky stejnou jako sacharosa, a je tedy jejím konkurentem.

Standardním postupem pro výrobu sorbitolu je katalytická hydrogenace glukosy za vysokého tlaku. Zkoušeli jsme i biochemickou přípravu sorbitolu na bázi fruktosy. Nejprve byl hledán vhodný producent enzymu sorbitoldehydrogenasy (L-iditol: NAD 5-oxidoredukta-sa, EC 1.1.1.14). Za tímto účelem byl testován větší počet mikroorganismů, přičemž kmeny *Bacillus subtilis* DBM 3006 a *Candida utilis* DBM 2107 a methylotrófní kvasinky *Candida boidinii* 2 prokazovaly vhodnou aktivitu sorbitoldehydrogenasy. U posledně jmenovaného mikroorganismu se pro produkci sorbitolu jeví jako nejvhodnější použití volných nativních buněk. Při laboratorních zkouškách v roztoku ubývala fruktosa, avšak obsah sorbitolu nerostl odpovídajícím způsobem. Pravedpodobně během transformace fruktosy na sorbitol se přednostně uplatňovaly glykolytické pochody¹⁷.

Podobně Hirarte et al.¹⁸ řešili možnost produkce sorbitolu ze sacharosy pomocí mikroorganismu *Zymomonas mobilis* CP4. Po 25 h inkubace byly získány konverze 57 % a 43 % substrátu na sorbitol. Vzhledem k nízké aktivitě glukosaoxidoreduktasy u kmenů divokého typu *Zymomonas mobilis* a její nestabilitě *in vitro* výzkumníci zlepšili účinnost produkce sorbitolu pomocí genetického inženýrství. Liu et al.¹⁹ vytvořili rekombinantní kmen *Z. mobilis* Zm4/pHW20a-gfo, dosahující výtěžek glukosaoxidoreduktasy 1,8 x vyšší

než u kmene divokého typu, s dalším zvýšením při přidavku dvojmocných kovových iontů. Stále však chybí zprávy o průmyslové biochemické výrobě sorbitolu.

Sorbitol je výchozí surovinou pro výrobu vitamínu C; asi 1/4 vyrobených roztoků sorbitolu se používá na výrobu askorbové kyseliny. Prvním krokem je oxidace na L-sorbose za přítomnosti *Azotobacter* při pH 4-6 a teplotě 30 °C.

Další možnou technologií je zpracování škrobu pomocí cyklodextrinylukanotransferasy (CGTase). Ta převádí škrob na neredukující maltooligosacharidy, nazývané cyklodextriny, intramolekulární transglykosylační (cyklizační) reakcí²⁰. Cyklodextriny se využívají především jako enkapsulační činidla.

Kyselina mléčná se poměrně rychle tvoří z glukosy pomocí *Laktobacilů* podle rovnice:



Význam této sloučeniny je hlavně pro výrobu kyseliny polymléčné (PLA), z které lze vytvářet např. biodegradabilní fólie.

Enzymové zpracování škrobu bylo také zkoušeno pro přípravu nanočástic. Chena et al.²¹ metodu porovnávali s kyselou hydrolýzou a zjistili, že nanočástice po aplikaci pullulanasy byly méně tepelně odolné a měly krystalinitu typu V. Použití kombinace kyselé a enzymové hydrolýzy by urychlilo celý proces.

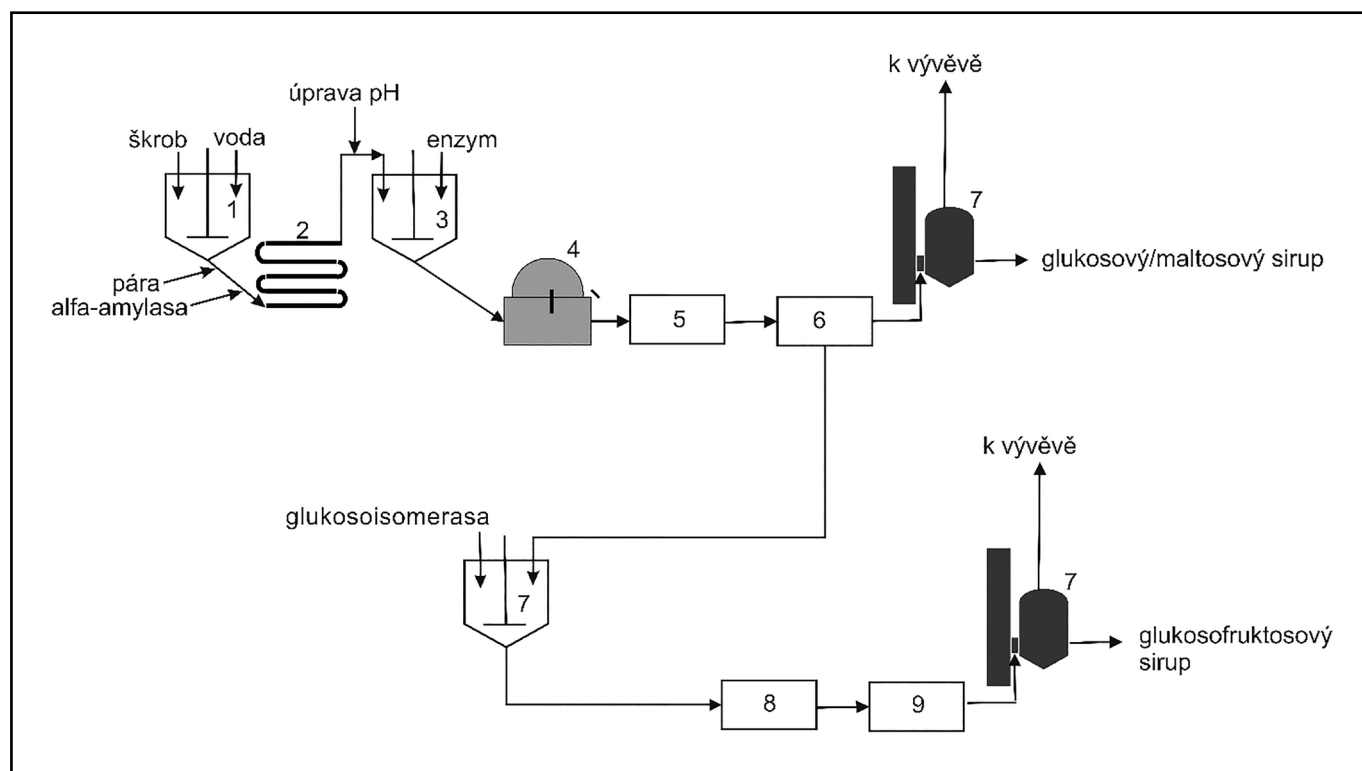
Suroviny sloužící k výrobě ethanolu či bioethanolu (bezvodého paliva) lze rozdělit na biomasu obsahující jednoduché cukry (např. produkty ze zpracování cukrové řepy jako je melasa či černý sirob), biomasu obsahující škrob (pšenice, brambory, kukuřice), do budoucna se uvažuje o lignocelulosoové biomase (sláma, rychle

rostoucí dřeviny, štěpky, odpad biologického původu, papír apod.). Spojené státy americké mají rozsáhlý bioethanolový průmysl založený převážně na kukuřici²², v České republice se kromě kukuřice získává ethanol ze pšenice, z melasy či černého sirobu. Enzymová hydrolýza škrobové suroviny a fermentace sacharidů je základem principem tradiční technologie.

Podobně se jeví jako zajímavá výroba biobutanolu pro využití ve spalovacích motorech. Kheyran-dish et al.²³ informovali o produkci butanolu z bramborového odpadního škrobu s využitím volných a imobilizovaných buněk *Clostridium acetobutylicum* NRRL B-591. Bramborový škrob byl přímo fermentován bez předchozí hydrolýzy. Patáková et al.²⁴ testovali 1-butanol produkovaný solventogenními *Clostridiemi* z různých škrobnatých materiálů (brambory, kukuřice). Autoři uvádějí, že butanol má řadu výhod oproti ethanolu: vyšší energetický obsah, omezenou mísitelnost s vodou, nižší tlak par a menší korozivnost.

Při roubování škrobu jsou monomery kovalentně navázány na hlavní polymerní řetězec a následně dále polymerizovány na tomto řetězci. Pro enzymové roubování Wang et al.²⁵ použili avidin-peroxidasu na roubování polymethylakrylátu na rozpustný škrob v přítomnosti peroxidu vodíku a acetylacetonu jako kokatalyzátoru.

Odpadní vody ze škrobárny lze úspěšně transformovat anaerobní fermentací na bioplyn. Anaerobní fermentace (metanizace) je ekologickou metodou, která dokáže s vysokou účinností efektivně transformovat organické látky na energii koncentrovanou v metanu. Při metanizaci směsná kultura mikroorganismů po-



Obr. 5: Enzymová hydrolýza škrobu na glukosové, maltosové a glukoso-fruktosové sirupy

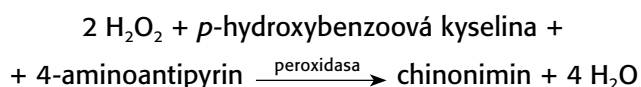
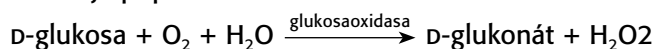
Legenda: 1 – zapouštěcí kád, 2 – ztekucení (reaktor s pístovým tokem), 3 – zcukření (míchaný reaktor), 4 – rotační vakuový filtr, 5,8 – ionexová filtrační, 6,9 – filtrační na aktivním uhlí, 7 – reaktor pro inverzi glukosy; enzym: β -amylasa nebo amyloglukosidasa

stupně rozkládá biologicky rozložitelnou organickou hmotu bez přístupu vzduchu. Konečnými produkty jsou vzniklá biomasa, plyny (CH_4 , CO_2 , H_2 , N_2 , H_2S) a nerozložený zbytek organické hmoty, který je již z hlediska hygienického a senzorického nezávadný pro prostředí, tedy je stabilizován²⁶.

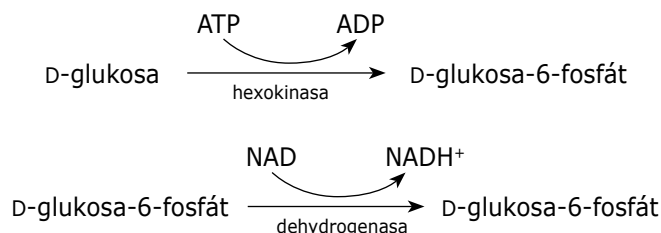
Analytické metody ke stanovení obsahu a stravitelnosti škrobu

a) Celkový obsah škrobu

Enzymové stanovení celkového obsahu škrobu zahrnuje mazovatění škrobu při zvýšených teplotách v přítomnosti termostabilní α -amylasy, kdy dojde ke ztekucení škrobu a vznikají tzv. limitní dextriny, které jsou následně kvantitativně hydrolyzovány na glukosu pomocí amyloglukosidasy. Uvolněná glukosa se pak stanoví spektrofotometricky po reakci s gluksooxidasovým/peroxidasovým činidlem (GOPOD). Průběh reakce je popsán rovnicemi:



Dalším používaným spektrofotometrickým stanovením obsahu glukosu uvolněné při enzymové hydrolyze je její reakce s hexokinasou a glukosa-6-fosfádehydogenasou v přítomnosti ATP a NADH^+ .



Metoda enzymového stanovení celkového škrobu umožňuje testovat celou řadu potravin, krmiv, rostlinných a obilných produktů (přírodních nebo průmyslově zpracovaných). Vzorky, které obsahují vysoké hladiny rezistentního škrobu, vyžadují předběžné rozpuštění ve studeném roztoku NaOH o koncentraci $1,7 \text{ mol.l}^{-1}$ nebo v horkém dimethylsulfoxidu (DMSO)²⁷.

b) Obsah amylosy

Tato metoda je někdy také nazývána lektinová metoda, protože je zde využita specifická vazba mezi amylopektinem a rostlinným lektinem konkavalinem A. Metoda se používá ke stanovení poměru amylosy/amylopektin ve škrobnatých materiálech. Nejčastěji se jedná o nativní škroby nebo mouky.

Toto stanovení má několik základních kroků. Prvním krokem je opakované odstranění lipidů z testovaného vzorku rozpouštěním v DMSO. Odtučněný vzorek

se rozpustí v roztoku octanu obsahujícím ionty Ca^{2+} , Mg^{2+} a Mn^{2+} . Dalším krokem je srážení amylopektinu lektinem konkavalinem A (ConA). Po odstředění zbyde v roztoku pouze amylosa, která je působením α -amylasy a amyloglukosidasy rozložena na D-glukosu. Následuje stanovení celkového škrobu, kdy se znovu použije roztok vzorku v octanu, který se hydrolyzuje amylolytickými enzymy na D-glukosu. Posledním krokem je stanovení glukosy²⁸.

c) Stanovení stravitelnosti škrobu

Postup stanovení je simulací podmínek trávicího traktu. Dobře rozdrčený vzorek se smíchá s pepsinem v kyselině chlorovodíkové o koncentraci $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ a nechá inkubovat 30 min při 37°C . Ke každému vzorku se také přidá enzymová směs skládající se z invertasy (EC 3.2.1.26), pankreatické α -amylasy a amyloglukosidasy (EC 3.2.1.3). Vzorek se vloží v uzavřené zkumavce do vodní lázně o teplotě 37°C a hned se spustí třepání.

Obsah rychle stravitelné glukosy se stanoví po 20 min třepání vzorku s enzymovou směsí. Poté se stanoví obsah pomalu stravitelné glukosy G_{120} po 100 min po odběru G_{20} . Nakonec se stanoví obsah celkové glukosy TG, kdy ve vroucí lázni dojde k inaktivaci enzymové směsi a k mazovatění škrobu. Z těchto hodnot se vypočte obsah rychle a pomalu stravitelného škrobu. Následuje zchlazení na 0°C a ošetření KOH (7 mol.l^{-1}) a po neutralizaci kyselinou octovou je vzorek hydrolyzován amyloglukosidasou. Rezistentní škrob se vypočte jako škrob, který zůstal nehydrolyzovaný po 120 min inkubaci²⁹.

Některé obrázky a odstavce textu byly převzaty z připravovaného skriptu Šárka E., Smrčková P., Kadlec P.: Chemie a technologie škrobu.

Závěr

V poslední době je věnována velká pozornost biochemickým přeměnám škrobu. Jde jednak o zpřesňování reakčního mechanismu biosyntézy a rozkladných procesů v rostlinách, včetně výzkumů v oblasti genetické modifikace. Biochemické průmyslové zpracování škrobu se týká výroby maltodextrinů, glukosových, maltosových a glukoso-fruktosových sirupů, případně až glukosy nebo fruktosy. Jejich další využití může směřovat k výrobě sorbitolu, kyseliny askorbové, kyseliny mléčné a polymléčné, k výrobě ethanolu a butanolu, cyklodextrinů, roubovaných kopolymerů škrobu a nanočástic škrobu. Současné analytické metody založené na enzymovém stanovení celkového obsahu škrobu, obsahu amylosy, rychle a pomalu stravitelného škrobu a škrobu rezistentního mohou být významným pomocníkem při tvorbě funkčních potravin a při návrhu potravinových receptur, které omezí energetické zatížení lidského organismu a zvýší obsah zdraví prospěšných butyrátů v tlustém střevu.

Literatura:

- Hlaváček F, Lhotský A: Pivovarství. SNTL, Praha 1966.
- Melzoch K (2012): kap. 6.3 Lihovarnictví a výroba lihovin. In: *Technologie potravin. Přehled tradičních potravinářských výrob* (Kadlec P ed.), KEY Publishing, Ostrava, 363 – 389.
- Tegge G: Stärke und Stärkederivate. Behr's Verlag, Hamburg 1984.
- Bahaji A, Li J, et al.: *Biotech. Adv.* 32, 87 (2014).
- Zhang H, Hou J., et al.: *Starch-Stärke*, 69, 1600194 (2017).
- Compart J, Singh A, et al.: *Polymers*; 15, 3491 (2023).

7. Van Arkel J, Sévenier R et al. (2014): Fructan biosynthesis regulation and the production of tailor-made fructan in plants. In: *Polysaccharides: Natural Fibers in Food and Nutrition* (Benkeblia N ed.), CRC Press, Boca Raton, 1-30.
8. Barrett A, Ndou T, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 61, 1477 (2013).
9. Englyst H, Kingman S, Cummings J: *Eur. J. Clin. Nutr.* 46, S33 (1992).
10. Šárka E, Smrčková P, Seilerová L: *Chem. Listy* 107, 929 (2013).
11. Jurkaninová L, Sluková M, et al. (2018): The evaluation of resistant starch in cereal food with higher moisture. In: *Proceedings of the 14th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience*, ČSCH, Praha, 172-177.
12. Shi J, Zeng K, et al.: *Food Hydrocoll.* 144, 109056 (2023).
13. Englyst KN, Liu S, Englyst HN: *Eur. J. Clin. Nutr.*, 61, S19 (2007).
14. Polesi L, Silveira Sarmento S. *Starch/Stärke* 63, 226 (2010).
15. Smrčková P, Demeterová J, Šárka E (2020): Monitoring of physico-chemical properties of pea and bean starches. In: *Proceedings of the 16th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience*, ČSCH, Praha, 105-109.
16. Chaplin M, Bucke C: Enzyme technology. Cambridge University Press, 1990.
17. Šárka E, Smolík J, Králová B, Bubník Z et al.: Zpracování sacharózy na sorbitol a fruktózový sirup – sladidla pro diabetiky / Závěrečná zpráva úkolu MZe EP 6606/. VUC Praha, 2001.
18. Hiriarte JN, Bravo S, Shene C: *Afinidad*, 60, 542 (2003).
19. Liu L, Li J-T, et al.: *Food Sci. Nutr.* (2022), DOI: 10.1080/10408398.2022.2139221.
20. Pardhi DS, Rabadiya KJ, et al.: *Appl. Microbiol. Biot.* 107, 5899 (2023).
21. Chena Aldao D, Šárka E, Ulbrich P, et al.: *Czech J. Food Sci.* 36, 133 (2018).
22. Hromádka J, Hromádka J, et al.: *Listy cukrov. a řep.* 126, 267 (2010).
23. Kheyrandish M, Asadollahi MA, et al.: *Fuel* 142, 129 (2015).
24. Patáková P, Lipovský J, et al.: *Czech J. Food Sci.* 27, 276 (2009).
25. Wang S, Wang Q, et al.: *Carbohydr. Polym.* 136, 1010 (2016).
26. Šárka E, Dohanyos, M, Homolka P et al. (2013): kap. 8 Zpracovatelské technologie. In: *Brambory • šlechtění • pěstování • užití • ekonomika* (Vokál B ed.). Profi Press, Praha, 138-150.
27. Anon. (2023): Total Starch (α -Amylase / Amyloglucosidase) Assay Protocol. https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-TSTA-100A_DATA.pdf, 16. 11. 2023.
28. Anon. 2 (2023): Amylose / Amylopectin Assay Protocol. https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-AMYL_DATA.pdf, 16. 11. 2023.
29. Bradová J, Štočková L, Smrčková P: Laboratorní hodnocení stravitelnosti sacharidů s možností predikce glykemického indexu, VÚRV, Praha 2015.

Souhrn:

Šárka E., Smrčková P.: Škrob – biosyntéza, nutriční vlastnosti, biotechnologie, enzymové metody stanovení jednotlivých forem

Škrob je biopolymer, obsažený v rostlinách a řasách. V zelených rostlinách se tvoří při fotosyntéze v chloroplastech jako tzv. tranzitní škrob, který je v průběhu temné fáze transportován v podobě rozpustných sacharidů do zásobních orgánů rostlin, kde je opět převeden do podoby škrobových zrn. Tato opětná syntéza se liší pro jednoděložné a dvouděložné rostliny. Průmyslově izolovaný škrob má řadu využití, hlavní roli hraje enzymová hydrolyza na sirupy, které pak mohou být výchozí látkou pro celou řadu dalších biochemických transformací. Článek se věnuje rovněž nutričním aspektům škrobu, především jeho stravitelnosti. Je popsán základní princip enzymových metod ke stanovení obsahu celkového škrobu, obsahu amylosy, rychle a pomalu stravitelného škrobu a škrobu rezistentního.

Summary:

Šárka E., Smrčková P.: Starch – biosynthesis, nutritional properties, biotechnologies, enzyme methods for determination of its individual forms

Starch is a biopolymer found in plants and algae. In green plants, it is formed during photosynthesis in the chloroplasts as so-called transitory starch, which is transported during the dark phase in the form of soluble carbohydrates to the storage organs of plants, where it is again converted into the form of starch granules. This repeated synthesis is different for monocots and dicots. Industrially isolated starch has a number of uses, the main role is played by enzyme hydrolysis into syrups, which can then be the starting material for a whole range of subsequent biochemical transformations. The article also deals with the nutritional aspects of starch, especially its digestibility. The basic principle of enzyme methods to determine the content of total starch, amylose content, rapidly and slowly digestible starch and resistant starch is described.

CULTIVATION OF MICROORGANISMS IN BIOREACTORS

Mark Terentyak^{1,2}, Vladimír Sýkora², Mária Zedníková^{1,2}

¹Institute of Chemical Process Fundamentals of the CAS, Prague/Czech Republic

²University of Chemistry and Technology, Prague/Czech Republic; terentym@vscht.cz; vladimir.sykora@vscht.cz; Maria.Zednikova@vscht.cz

Introduction

Industrial biotechnology is an important part of current world. It takes place in pharmacy, food production, energetics and many other parts of human activities. Bioreactors are heart of every biotechnological process and their success entirely depends on them. Bubble column is specific type of bioreactor and is commonly used for the cultivation of shear sensitive cells. This work presents a brief comparison between bubble column and stirred tank reactor, discusses their advantages and disadvantages and reviews few common cultivations.

Bioreactors and biotechnology

Biotechnology has been a part of human production for thousands of years. One of the oldest examples comes from Egypt, where in 3000 BC the Egyptians were using simple bioreactors, vessels with controllable conditions used for the biotechnological process, to make bread and cheese. About 2000 BC, the Chinese were utilizing bioreactors and distillation for production of ethanol. Over time biotechnology slowly developed until the twentieth century, when several discoveries launched broad development of biotechnology. For example, the discovery and mass production of penicillin and citric acid, which began in the USA. Biotechnology these days is much more complex and allows higher control over the entire cultivation system, thanks to discoveries in several scientific disciplines¹. Biotechnology is not a single scientific discipline but a combination of several others, namely microbiology, biochemistry, chemical engineering, genetic engineering and molecular biology². The process itself is not just what happens inside the bioreactor, but also what happens before, called upstream processes, and after, called downstream processes. Upstream processes include reactor design, selection and preparation of cell culture, preparation of nutrients etc. Downstream processes include isolation and purification of the final product, cleaning of bioreactor, repairs etc.³.

Bioreactors connect starting materials and final products and they are the center of every biotechnological process. Design of every bioreactor is unique and changes according to certain process. Its design will affect effectivity of the process as well as the quality and cost of the final product. Primary objective of every biotechnological process is to utilize biological system while keeping maximal conversion yield of starting materials to final product and minimal production costs². The bioreactor in general is a tank or a vessel containing cells or enzymes which transform substrate to the final product and/or to the less undesirable byproduct. It is a complex system of pipes, valves, sensors and

pumps. They are usually cylindrical in shape and their size varies from liters to hundreds of cubic meters¹.

Size and scale-up

Massive bioreactors are not just bigger but also much more complex compared to small variants. An illustration of a scale-up process is shown in Figure 1. Smaller bioreactors are very common in laboratories and are classified into "laboratory-scale bioreactors" or just "lab-scale". Petri dishes, jars, Erlenmeyer flasks and roller bottles are the most common examples. They are easy to use in large numbers and easy to operate. Temperature is easy to control, usually by changing the temperature inside laboratory. Homogenization is usually not necessary and if so, it is done by simple means like a shaker. Aeration is also easily performed by surface aeration. Ratio between liquid surface and liquid volume is pretty small, which leads to relatively high gas transfer through free liquid level. The main role of these small bioreactors is not to produce desired product but to gain data about microorganisms, different substrates and cultivation conditions and decide if large-scale cultivation is even possible and worth to perform⁴. This testing phase requires screening a large number of possible combinations and therefore requires a significant amount of time. Afterwards, most promising variants move on to the next phase and which is "pilot-scale" testing⁵.

Pilot-scale is the middle point between lab-scale and industrial production. The size of pilot-scale bioreactor is between 25 and 50 % of the industrial version and it is much more complex compared to lab-scale variants². Pilot-scale is a simulation of full-scale industrial production and its main objective is to identify whether the process can be used in industry or not and to optimize the entire process⁵. Scale-up can't go to infinity. Above some critical volume, new problems start to appear, which put restrictions on the final design. This is the reason why the variety of large bioreactors is less wide compared to lab-scale². There are five main items needed for functional bioreactor design:

- stoichiometry
- thermodynamics
- microbial kinetics
- transport phenomena (mass and heat transfer)
- economics.

Stoichiometry, thermodynamics and microbial kinetics are not dependent on the scale of the process, however transport phenomena and economics are the exact opposite⁵. Mass transfer is a typical problem for every process where cells require a steady supply of oxygen or when water insoluble nutrient is used. Heat production usually comes from cell metabolism.

Heat production increases linearly with volume, however surface increases with the square of the power and the volume with the third power of the reactor dimensions. In other words, the heat production quickly overcome the vessel's own cooling capabilities, thus external cooling is necessary².

Economics plays a significant role in the bioreactor design and operation. Expenses can be divided into three groups. The first group is given by development and construction costs, which are expensive and time-consuming investments. The second group includes the operating costs, such as electricity, cleaning, maintenance and trained personnel⁴. The third group includes production costs like cell lines and raw materials. Despite these expenses, the whole process must be profitable. Even well-known biotechnologies, like the production of citric acid, are not perfect. New materials, new cell lines, new media composition and many other aspects are being researched to increase the effectivity of the processes to maximum and while keeping their costs to a minimum.

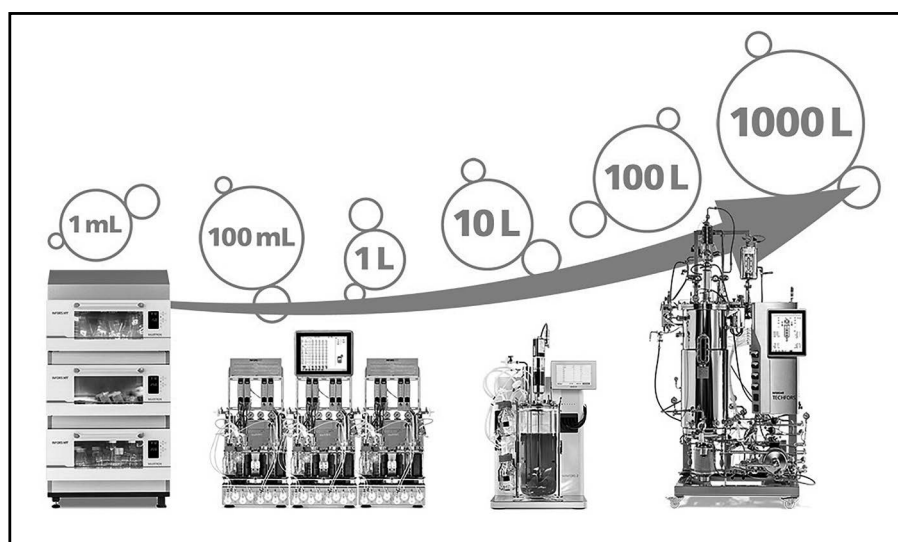


Figure 1: From lab-scale to industry; figure taken from ref.⁶

Condition control

As mentioned before, bioreactors are vessels that allow control over cultivation conditions¹. There are vast amounts of organisms, each with its own unique characteristics and optimal conditions, some of which are quite extreme⁷. These conditions are absolutely necessary to know for efficient operation of every biotechnological process.

Cultivation media

Every living organism, whether used in biotechnology or not, needs some form of nutrition for its survival. Cells utilize nutrients for their growth, multiplication, synthesis and energy. Nutrients are not just organic compounds like sugars and vitamins but also inorganic compounds such as CO_2 or NO_3^- ions⁷. Elements which form nutrients are categorized into four groups: macroelements, microelements, trace elements and non-essential elements. Macroelements (C, H, O, N, P and S) form most of the cells' dry weight and are needed in relatively high concentrations in cultivation media.

Microelements (Fe, Ca, Mn, Co, Cu and others) are required by most cells, but in much lower quantities. Trace elements (Se, W and others) are essential as well, but their required amount is so small, that cell needs are usually covered by contamination of other salts used for media preparation⁸. In general, the nutrition needs are reflected in a cell's natural environment. Detailed knowledge of the environment and chemical compositions can be a great help in process design. Control over cell nutrition is achieved mostly through media composition. Media composition is not just about having right elements in their plausible form, but also about their amount and ratio to other elements, since each organism has its own needs for every essential element. There are also some organisms which can utilize multiple sources of one element. In this case, the most easily available molecule is chosen. Media composition does not change just with the organism, but also with the aim of the cultivation⁷.

A good example can be assumed the cultivation media of *Aspergillus niger* in citric acid production.

For optimal production, *A. niger* requires high concentrations of sugars, above $120 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, and very low concentrations of heavy metals⁹. Another example can be the media for cultivation of mammalian cells, which must contain sources of macro and microelements, but also growth factors and amino acids¹⁰.

Aeration

Nutrients present in cultivation media are not the only substances necessary for cell growth. Gases, such as CO_2 or oxygen, are equally important as any other nutrient in media. Air, as the most available gas, is used as the carrier gas to supply the proper gaseous component to the liquid.

In the case of photoautotrophic microorganisms, CO_2 is a carbon source for photosynthesizing cells as well as a pH driver for the cultivation medium. However, the amount of CO_2 in the air is about 0,03 %, which is very low and often limiting for cultivation. Therefore, air is often enriched by CO_2 up to 10 %⁷. An example of such CO_2 enrichment is biomass production of cyanobacteria *Spirulina maxima*¹¹, whose biomass is popular food additive.

In aerobic cultivations, air does not need any oxygen enrichment. However, there are other problems related to lower O_2 solubility, which is considerably less soluble in water than CO_2 . Media are usually water-based¹² and the solubility of oxygen in pure water, at 25°C and air used as aeration gas, is $2.56 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, which is very low in general¹³. This causes many complications in the design and operation of the process, because cells utilize oxygen dissolved in liquid media and not directly from gas bubbles. The careful control of oxygen supply is then highly desirable. There are many aerobic cultivations, which some of

them influence our day-to-day lives. A typical example of aerobic cultivations is wastewater treatment¹⁴, which uses a mixture of different microorganisms to remove organic and inorganic wastes. Another typical example of aerobic cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*, better known as baker's yeast¹⁵.

The problem of oxygen transfer has been addressed almost from the beginning of the research in chemical engineering. Due to the low solubility and high consumption of oxygen by cells, oxygen must be continuously supplied to the system. At some point, the oxygen mass transfer can be used as a controlling step for aerobic cultivations. The concentration of oxygen in media depends on oxygen transfer rate (OTR) from gas to liquid and oxygen uptake rate (OUR), which is fundamental physiological characteristic of cultivation media. OTR is described by the volumetric mass transfer coefficient $k_L a$, where k_L is liquid side mass transfer coefficient and a is interfacial area per liquid volume. OTR is affected by properties of liquid, hydrodynamics and geometric parameters of the bioreactor. Each bioreactor and each specific biotechnology has its own value of $k_L a$ ¹² and therefore, the volumetric mass transfer coefficient is the key design parameter of bioreactors.

pH

pH control, along with temperature, is one of the first parameters discussed in industrial cultivations. The reason behind this is that both specific growth rate and product formation rate are strongly dependent on pH¹⁶. The aim of pH control is to maintain pH within desired range and it is usually done through addition of acid or alkaline. However, the addition of acid or alkaline can lead to a large local change of pH, which can negatively affect the whole process either by damaging cells, enzymes or the desired products. Moreover, this effect worsens with increasing scale, because large vessels have longer time necessary for homogenization. This is often a challenging problem during the design process¹⁷. Furthermore, the addition of acid and alkaline significantly increases the osmolality of the medium, which can negatively affect the process as well¹⁸. Fortunately, there are other ways how to solve such problem, for example, the addition of acid can be replaced by CO₂ sparging. This system is usually used on media containing carbonates or bicarbonates and offer a good solution for osmolality problem.

Change of pH during cultivation can be caused by several reasons. The first case is the CO₂ produced by cells. This can be solved by pH regulation mentioned above or just by efficient CO₂ removal. The second possible reason is the production of metabolites which affect the pH of media, such as organic acids¹⁷. Another reason is the consumption of the carbon source like carbonates or bicarbonates, which affect the pH of the medium. There are several solutions of this specific case like the addition of CO₂ to the aeration gas, addition of the carbon source or addition of the acid¹⁹.

Temperature and heat

Heat control of bioreactors is also discussed right at the beginning of the design process because specific growth rate and product formation rate are strongly dependent on temperature¹⁶. Moreover, temperature also influences biochemical composition of cells and their physiology³. Every organism has its own temperature requirements and can be characterized by its minimum, optimum and maximum growth temperatures, also known as "cardial temperatures". Organisms are usually categorized to three different groups according to their cardinal temperatures: psychrophiles, mesophiles and thermophiles⁷. The cardinal temperatures of psychrophiles are below 20 °C. In some cases, cells grow even under temperature below 0 °C. Mesophiles are the most common. Their cardinal temperatures are between 25 °C to 40 °C. In the case of thermophiles, their cardinal temperatures are above 55 °C. Cultivation of thermophiles or psychrophiles is more energetically demanding due to the intensive heating or cooling requirements compared to mesophiles, thus thermophiles and psychrophiles are not so often used in industrial cultivations.

Heat management of bioreactor is often a difficult problem in industry, because of the large amount of heat generated by the cell metabolism. Heat removal is proportional to the surface area of the vessel. There is a maximum size of the vessel that can be cooled without an additional cooling unit². Evaporation of water also helps to cool down the bioreactor, but at some point it isn't sufficient²⁰. Additional cooling/heating units can substantially increase heat transfer and enable the usage of larger vessels. External jackets placed around the vessel and internal coils placed inside the vessel are the most frequently used heat controllers followed by double walled baffles and draft tubes²¹. These units help in terms of heat management, however, the temperature problem can be reduced also biologically. Even a small change in nutrient composition can improve the heat management, because some nutrients have better conversion efficiency than others. By choosing a more efficient nutrient, heat generation can be reduced². However, the usage of these nutrients is not necessarily more economical because they are usually more expensive.

Homogenization

Proper homogenization maintains a suitable environment for cultivation. It prevents the formation of gradients in heat, concentrations and light in the case of photobioreactors. Homogenization also prevents cell sedimentation at the bottom of the bioreactor, which could lead to cell starvation and death³. Appropriate homogenization requires sufficient mixing. This needs a certain power input, which is limited by physical, mechanical and biological restrictions. At some point, homogenization can become so intense that cell damage begins to occur. This is a problem in cultivations with large volume, where cells are limited by O₂ supply and also by shear forces¹². Fortunately, there are ways, how to encounter this problem, for example, by changing the dimensions of the bioreactor.

Dimensionality is an important factor in homogenization in general, because it dictates the optimum value of power input²⁰.

Mixing by stirrer provides excellent homogenization of liquid phase. In general, bioreactors equipped with stirrers have high values of mass and heat transfer. The operation of this system is influenced by several variables that affect the mass transfer and mixing: number and type of stirrers, their dimensions, gas flow rate and stirrer speed⁵.

Another way of mixing in bioreactor is by aeration. Mixing by aeration is typical for bubble column and airlift bioreactors. Aeration does not have such intense mixing as stirred tank bioreactor, but has much lower values of shear stress. This is great advantage in cultivation of mechanically fragile cells, e.g. mammalian cells⁵. However, overcoming the optimal aeration rates can cause cell damage. No matter which way of mixing is used, each of them must consider dimensionality of the vessels, amount of liquid necessary to homogenize, cell resistance to shear stress and optimum mixing time³.

Types of cultivations

There are three major types (or modes) of cultivation. Each type has its own advantages and disadvantages and offers various applications. These three major types are batch, fed-batch (also known as semi-continuous) and continuous cultivation. They can be combined with different types of bioreactors and with or without aeration. The most significant advantages and disadvantages of particular cultivation modes are listed in Table I.

Batch

Batch cultivation is the best representation of what cultivation actually is. It is easy to perform compared to other types, and it has extensive uses²¹. In batch cultivation, the bioreactor is a partially closed system. Most of the material are added into the vessel before the beginning of the process, which is usually addition

of nutrients and cells or enzymes. Volume during the process usually does not change. At the end of the process, all contents are removed and the downstream process is performed elsewhere. Meanwhile the vessel is cleaned and prepared for another batch cultivation. The only materials added during the cultivation can be a pH controlling agents, an antifoam solutions and in some cases the gas, the excess of which is subsequently removed¹.

Batch cultivation has several strong advantages. As mentioned before, it is very versatile, because every cell line used in industry can be cultivated in batches. Minimal addition of any excess materials significantly reduces any risk of contamination. The disadvantages of batch cultivation come mainly from preparation procedure. Each batch requires cleaning, sterilization and filling which takes a considerable amount of time and labor²¹. Another disadvantage are very high concentrations of nutrients. Since there is no addition during the process, all necessary nutrients must be added at the beginning. This often leads to inhibition of cell growth at the beginning of the cultivations²².

Cultivation of microalgae is done in batch mode, but also in fed-batch and even in continuous mode²³. Microalgae are source of several high-valuable compounds such as phycobiliproteins, carotenoids and others. Productivity of these compounds can be controlled by growth conditions, which can be altered by change of cultivation type. Batch cultivation is also used in wastewater treatment²⁴. The bioreactor goes through a sequence of five steps: filling, aeration and mixing, settling, drawing and idle. These five steps are typical in water treatment and bioreactors used in water plants are often referred as "sequencing batch reactors".

Fed-batch

Fed-batch or semi-continuous cultivation is between batch and continuous cultivation. The principle is same as batch cultivation, but with one key difference.

Table I: Comparison of cultivation types

Cultivation type	Advantages	Disadvantages
Batch	Simple Versatile Low risk of contamination	Frequent cleaning and filling Inhibition by nutrients
Fed-batch	No inhibition by nutrients Feed control High cell concentration Effective usage of nutrients	Higher risk of contamination Concentration gradients in larger scales
Continuous	No inhibition by nutrients Effective use of space High productivity Less cleaning and preparation Constant quality of products Constant production rate	High risk of contamination Spontaneous mutations Inflexible Concentration gradients in larger scale

At the beginning, the bioreactor is filled only partially. At certain point, when cells reach desired concentration, additional medium is added, either continuously or intermittently, without any outflow¹. Antifoam and pH controlling agents are added as well if needed.

The main advantage of fed-batch cultivation is the control over media addition. This eliminates the problem with high initial nutrient concentrations in batch cultivation. Moreover, the feeding can be controlled specifically according to the situation and cell line used, which increases production and decreases material consumption. This also helps to reach much higher cell concentrations compared to batch cultivation²². However, every addition during the cultivation increases the risk of contamination¹. Another disadvantage of fed-batch cultivation is the absence of standard feeding regime, since every cell line has different growth rate and requirements. Another major disadvantage occurs in larger scale bioreactors. During pulse additions, homogenization time increases with vessel size²².

Fed-batch cultivation is used in production of fatty acid ethyl ester produced by genetically modified *Escherichia coli*, which is used in biodiesel production²⁵. Fed-batch is also used in production of baker's yeast¹⁵. Fed-batch significantly increases production, compared to batch variety.

Continuous

Continuous cultivation starts with simple batch cultivation. At a certain point, a fresh medium is added to the vessel, just like in the fed-batch version, however, there is an outflow. Under steady-state conditions, the inflow and outflow are kept equal, thus final volume remains constant. Concentrations of nutrients, metabolites and cells are almost constant with small fluctuations¹.

Continuous cultivations very efficiently utilize bioreactor capacity and have high productivities, which can be maintained for a long time. This saves a considerable amount of time and materials necessary for cleaning and preparations, compared to batch cultivations. The product made has a constant quality and it is produced at constant rate²¹. Continuous feeding solves cell growth inhibition, similarly to fed-batch cultivation, however there is a similar problem with homogenization time²². Another disadvantage is spontaneous appearance of mutant cells, since continuous cultivations take a long time²¹. Risk of contamination is also increased due to continuous feeding. Continuous cultivations are quite inflexible and usage for different process requires many adjustments and retrofitting.

An example of continuous cultivation is the production of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid²⁶. These acids are produced by species *Rhodomonas*, whose biomass is commonly used in sea food farms, due to its high amounts of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. However, continuous cultivation is not entirely optimized yet and still requires some research. Another example is the production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus*. 27 conducted experiments focused on improvement of continuous production. They used a two-stage membrane cell-recycler to capture cells from the out-

flow of the vessel and introduced them back to the vessel. This modification considerably increased cell concentration, which led to higher lactic acid production.

Types of bioreactors

Bioreactors are diverse devices with various characteristics and features. In the previous section, the bioreactors were classified by size. However, this classification does not say much about how the bioreactor actually operates or for which cultivations it can be used.

There are two main groups of bioreactors: mechanically and pneumatically mixed¹. The mechanically mixed reactor is the stirred tank bioreactor, which can be operated in all three cultivation modes (batch, fed-batch and continuous). Pneumatically mixed reactors are bubble columns and airlift reactors, both of which operate mostly in batch and fed-batch cultivation modes. This work compares the stirred tank bioreactor with the bubble column bioreactor.

Stirred tank

Stirred tank reactor (STR) is a cylindrical vessel equipped with a motor-driven stirrer²¹. Size of STR varies between liters, usually made from glass, and hundreds of cubic meters, usually made from stainless steel. Aspect ratio of STR ranges between 1:1 to 6:1. In most cases, aspect ratio is lower rather than higher, because smaller STR have few advantages. Small STR takes less material to build, is easier to clean and its homogenization requires less energy¹. Operating volume of STR is usually around 75 – 80 % of its maximum volume. The head space serves as disengagement of any droplets from outgoing gas and compensates for the appearance of foam²⁸. A simple schematic of single-impeller STR is shown in the Figure 2.

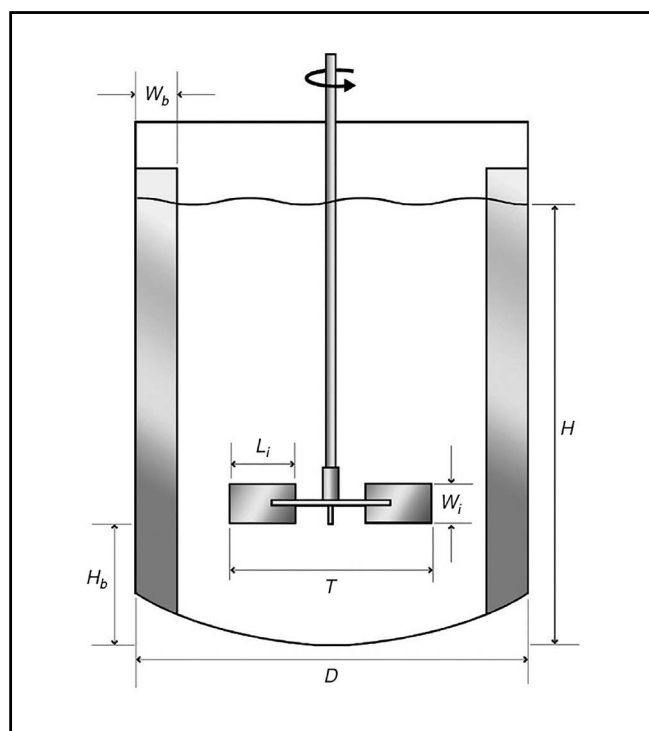


Figure 2: Single-impeller STR scheme; figure taken from ref.²⁸

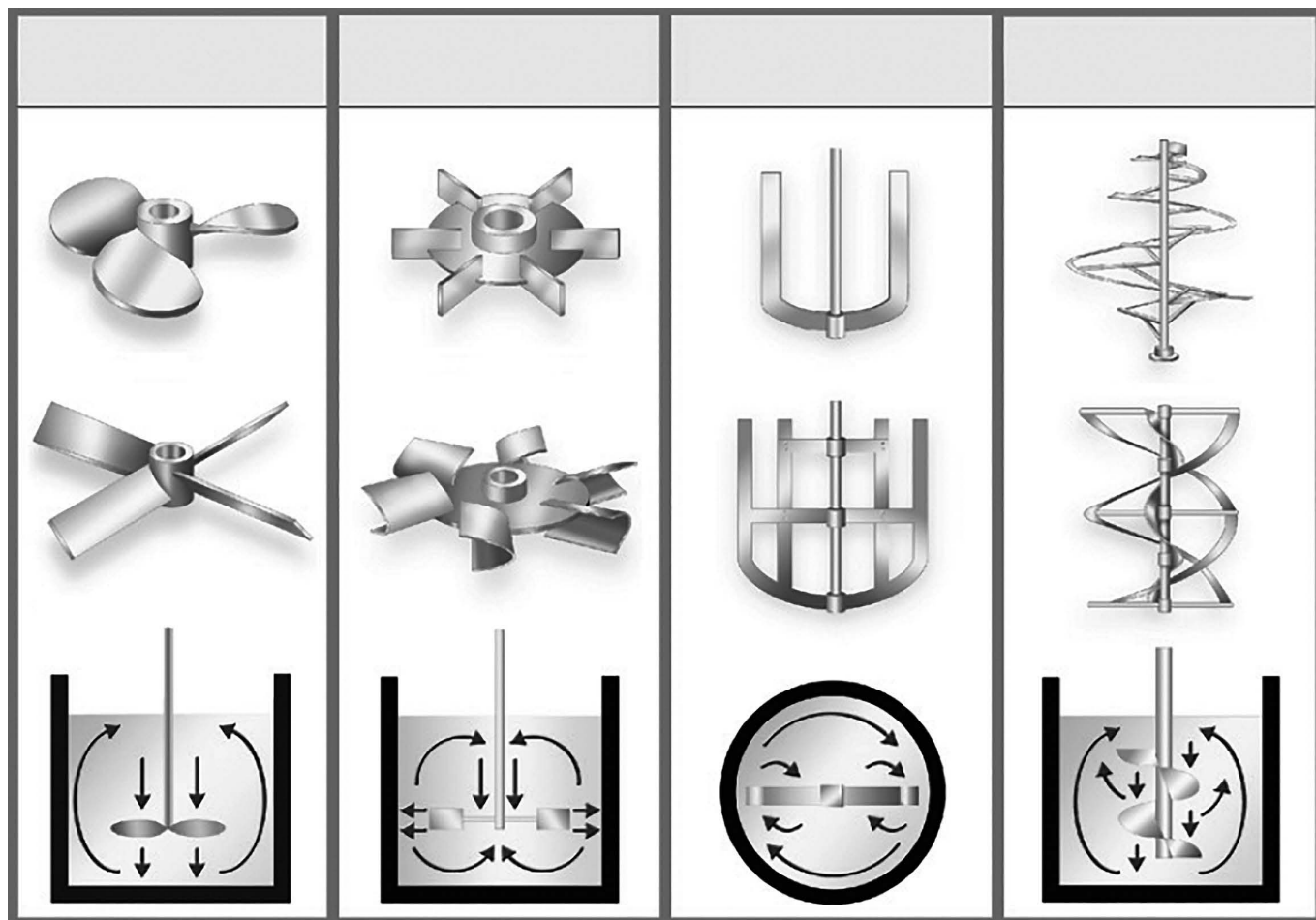


Figure 3: Examples of different stirrers and their flow patterns; from left to right: propeller and pitched blade, turbine, anchor, helical stirrer; figure taken from ref.²⁸

STR is the most frequently used type of bioreactor and takes place in approximately 90 % of industrial bioprocesses, both microbial and enzymatic. One of the reasons is highly efficient homogenization²⁸.

In STR, homogenization is carried out by a mechanical stirrer. Mixing inside STR is presumed to be sufficiently intense and uniform, thus, the liquid properties are effectively homogenous²⁸. The shaft of the stirrer can enter the STR through its top or bottom section²¹. There are many kinds of stirrer shapes and each of them creates different flow patterns, as shown in Figure 3: Examples of different stirrers and their flow patterns; from left to right: propeller and pitched blade, turbine, anchor, helical stirrer; figure taken from ref.²⁸. To prevent the center vortex creation by stirrer, the baffles are installed at the walls. Baffles are vertical strips attached to the inner wall of the STR. Beside preventing the central vortex, the baffles intensify the homogenization²¹.

Aeration is another phenomenon influencing the homogenization. The gas distributor is positioned under

the stirrer to allow sufficient bubble breakage that considerably increases gas-liquid interface and supports mass transfer. STRs used in aerobic cultivations usually have higher aspect ratio. This increases resident time distribution of bubbles, which prolongs contact time between bubbles and liquid phase, enhancing the mass transfer between phases. However, higher STR needs additional stirrers to keep the homogenization at the same level as in single-impeller configuration^{28,29}.

Geometry of STR influences the number of parameters controlling the cultivation. The mechanical design affects the hydrodynamics, which in turn affects the mass and heat transfer, gas holdup and shear forces^{5,28}. Due to efficient design of STR, it is needed to keep the geometrical similarity of scaled-up bioreactor. For this reason, the standard configuration of STR is commonly preserved, which holds the geometrical ratios in the range given in Table II²⁸.

Table II: Typical geometrical ratios used for design and scale-up of STR. Symbols are explained in Figure 4:

T/D	H/D	L/T	W/T	H_b/T	W_b/D
0.3-0.6	1-6	0.25	0.20	1.00	0.01

STR in general is an efficient bioreactor applicable in batch, fed-batch and even continuous cultivations. Intense mixing and quick homogenization are great advantages and are often necessary for success. Nonetheless, there are cases where these characteristics are not desirable. Every cultivation is carried out with respect to properties of used cell line like oxygen requirements, optimal temperature and resistance to shear stresses⁴. Mammalian, plant and mold cells are highly sensitive to shear stresses and their cultivation in STR is often problematic. Change of stirrer or decrease of stirring speed are possible solutions, however, they bring the problem of non-efficient homogenization¹.

An interesting example is the production of artemisinin. Artemisinin is drug used in combination therapy for malaria treatment. This drug is produced by plant *Artemisia annua*, however its current supplies are not enough to satisfy huge demands. 30 developed a cultivation in STR, where they cultivated hairy roots from *Artemisia annua* with *Agrobacterium rhizogenes*, which enhanced the growth of hairy root cells.

Bubble column

Bubble column (BC) is a cylindrical vessel equipped with gas distributor at the bottom of the vessel without any mechanical stirrer³¹. Compressed gas is delivered through the distributor, which can be perforated pipes, plates or membranes. Homogenization, heat and mass transfer are influenced mainly by properties of the liquid, gas flow rate and gas distributor. Basic design of columns is quite simple, however, it can be modified by internal components like horizontal perforated plates, vertical baffles and corrugated sheets (Figure 4: Simple BC schematic; a – simple BC, b – horizontal perforated plates, c – vertical baffles, d – corrugated sheets

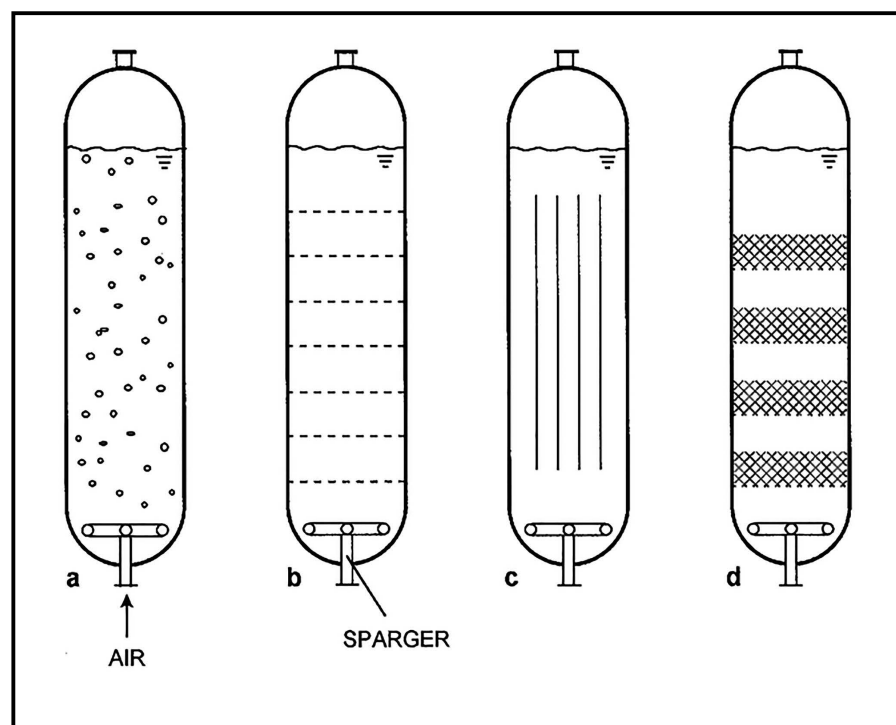


Figure 4: Simple BC schematic; a – simple BC, b – horizontal perforated plates, c – vertical baffles, d – corrugated sheets; figure taken from ref.³²

baffles, d – corrugated sheets; figure taken from ref.³²). These modifications can improve homogenization and mass transfer without increasing the gas flow rate, which makes an advantage in terms of operational costs. A typical feature of BC is the high aspect ratio (ratio of liquid height to column diameter H/D). The aspect ratio is considerably higher than in STR and it typically ranges between 4:1 to 8:1²¹.

Gas distributor serves as homogenization element and gas delivery system³. Homogenization can be affected by changes in column geometry, changes in gas flow rate and in change of gas distributor, which are similar to changes of stirrer in the case of STR. There are several different types of gas distributors such as, perforated plates, porous plates, membrane rings distributors and arm spargers (examples shown in Figure 5: Examples of gas distributors; figure taken from ref.³⁴). Each of them has its own effects on bubble characteristics, which alter hydrodynamics and therefore, the homogenization, heat and mass transfer in the column¹.

There are two main hydrodynamic flow regimes in BC, homogenous regime and heterogenous regime³³. The homogenous regime is produced by plate gas distributors with small openings and small spacing between them. Homogenous regime appears at low gas flow rates, where uniform layers of the same size bubbles appear. Heterogenous flow regime can be produced by same gas distributors as the homogenous one, but with higher gas flow rates or by plates with large openings at any gas flow creating non-uniform bubbles. These bubbles have large differences in their size and have a strong tendency to coalesce, which creates more turbulent flow compared to homogeneous regime. These regimes have major influence on hydrodynamics inside Bc.

BCs were developed specifically for cultivation of shear force sensitive cells, such as mammalian cells and fungi. Construction of BC is quite simple in comparison to STR. Although BC is not so frequently used as STR, it is unreplaceable in cultivations of cells with low tolerance to shear forces¹.

Comparison of BC and STR

BC and STR are two entirely different bioreactors, thus their comparison strongly depends on situation at hand. Every bioreactor is carefully designed to fit need of specific cultivation and production. However, there are several criteria that are crucial during selection procedure. This work compares BC and STR in six different criteria:

- Homogenization efficiency
- Usability
- Complexity
- Breakability
- Maintenance and cleaning
- Economy

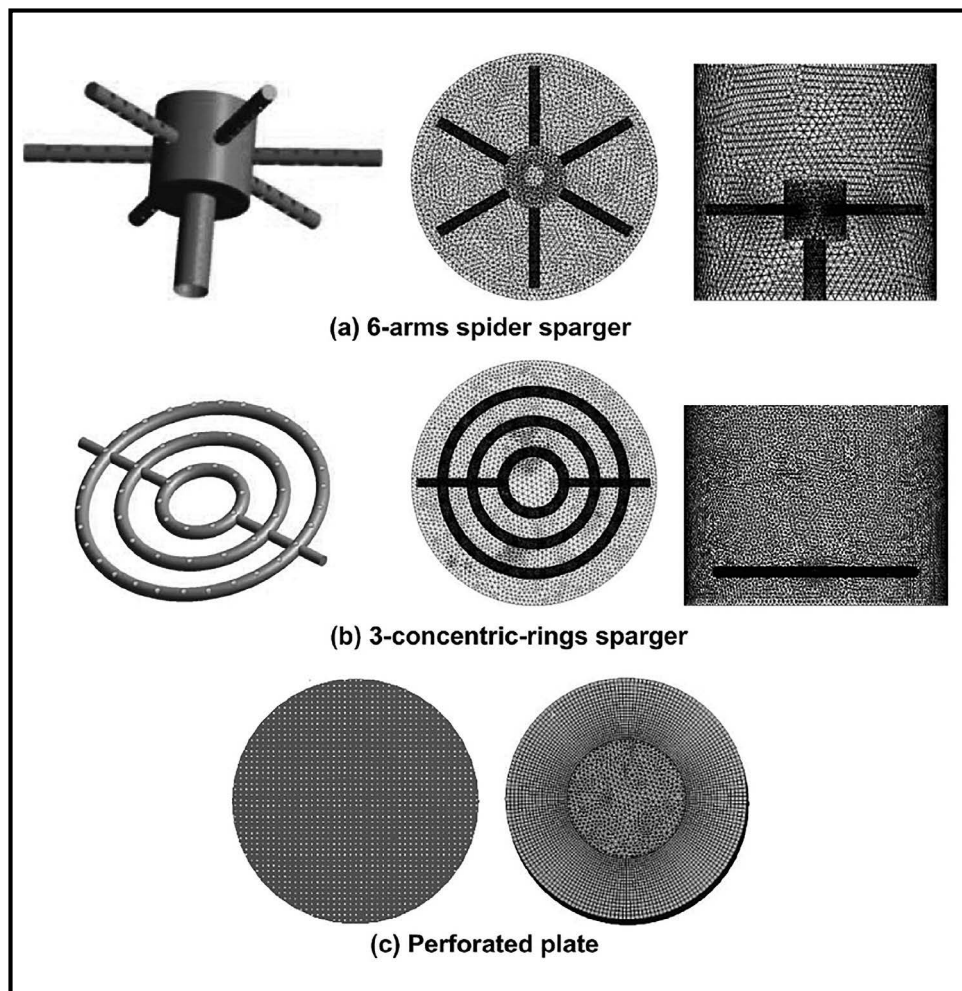


Figure 5: Examples of gas distributors; figure taken from ref.³⁴

Homogenization is a key element in almost every cultivation. Mechanical homogenization in STR significantly increases homogenization efficiency that STR is often considered as the first choice of bioreactor. However, the homogenization depends on stirrer type used and stirring speed which can considerably increase operational costs. Even though, the aeration in BC is not so effective as in STR, it is sufficient to be used in cultivations^{5,28}.

Large number of different modifications allow STR to be used in almost every type of cultivation, which is the main reason why STR is most frequently used bioreactor. STRs are diverse, they have wide range of usability, but they produce relatively high shear stress on cells. STR can be modified to be more suitable for fragile cells, but even these modifications have their limits. BC is much more suitable for cultivation of fragile and filamentous cells than STR. Homogenization via pneumatic way is convenient and does not damage the cells, if the gas flow rate does not exceed a critical point.

BC's base construction is simple compared to STR. This is an advantage also in economics. Simple reactor is not just easier to build, but also easier to design and operate.

Breakability of each mechanical component comes from many factors like frequency of use, materials used, complexity and others. In terms of complexity,

complex mechanical components have higher tendency to break than simple ones. The main mechanical part of BC is its gas source. On the other hand, STR has motor-driving stirrer and can be equipped with a gas source as well. Complexity of STR is advantage in its usability, but it also gives disadvantage in terms of breakability. For sake of simplicity, the side systems like pH and temperature control are not considered because their influence on the breakability of BC and STR are the same.

Maintenance and cleaning partially depend on complexity and breakability. If BC is operated without internals, it is only the cylindrical tube very simple for maintenance and cleaning. Complex bioreactors such as STR, need more maintenance in general due to various internals placed inside the bioreactor (shaft, impellers and baffles).

Economy is the most important criteria of every industrial cultivation. There are plenty of expenses in industrial cultivations, some of

which are mentioned above and it is difficult to make a reasonable comparison. The investment costs of BC are lower in comparison with STR, due to BC's simplicity. Also, the operational costs in BC can be substantially lower as well due to absence of mechanically-driven parts. However, the production effectivity and yields does not need to reach the same values as in STR. Production, effectivity and product value are dominant factors that dictate the amount of earnings. Production and effectivity depend entirely on bioreactor and cultivation. Without a specific process in mind, it is hard to say, if BC is more economically more convenient than STR, since this dilemma is too situational.

Examples of production

Citric acid

Citric acid is widely used across in various parts of industry (food, pharmacy, personal care, cleaning etc) and its usage grows every year. It is probably the most commonly used organic acid in general due to its relatively low production cost, easy biodegradability and safety⁹.

Submerged cultivations are usually used for its production. Other types of fermentations, such as solid-state cultivation are possible, but they have lower productivity and yields, higher operation costs, higher

risk of contamination and take more space than submerged variety³⁵. It is true that submerged cultivations have more complex equipment, but are easy to automate, which is another strong advantage over the other varieties. Overall, submerged cultivations take place in 80 % of word production in citric acid industry⁹. In this case, the most commonly used bioreactors are Bc. STRs are also used, but despite all their advantages mentioned earlier, they make up only a minority of production. Reason behind is that BCs are cheaper, easy to control and are suitable for filamentous organisms³⁵. This detail is quite crucial, because the main producent of citric acid is filamentous fungus *Aspergillus niger*.

A. niger is able to utilize cheap materials like liquified corn flour or molasses and at the same time produce huge amounts of citric acid. Quality and quantity of sugar used is a key factor for achieving high production. Concentration of sugar used should be in range of 120 to 180 g·l⁻¹, depending on the sugar used⁹. Initial sugar concentration affects not only production but also the morphology of producing cells³⁶. High concentrations of sugars inhibit the activity of α -ketoglutarate dehydrogenase and decrease the production of undesired byproducts and thus increase yields. Process is very sensitive to presence of heavy metals as Zn, Mn, Fe and Cu. These metals must be kept under specific limits, otherwise activities of key enzymes are altered. Cultivation is also sensitive to pH, which has to be changed depending on cultivation phase. Starting pH must be above 5 for better mycelium formation and after that the pH is lowered to 3, when production begins. pH 3 is necessary to inhibit production of other byproducts and in addition minimalizes risk of contamination⁹.

In industry, production is carried out in large-scale batches. Although the production has a long tradition and has been well optimized over the last one hundred years, there are new approaches and ideas for production. One of these ideas is utilization of yeast as a producing organism. This allows transfer to continuous cultivation, which has a potential in holding its ground against large competition on today's market³⁷.

Biofuel

Biofuel refers to solid, liquid or gas fuels made from renewable sources, mainly produced from biomass. Different compounds like bioethanol, biogas, biohydrogen and lipids or oils take part in biofuel industry³⁸.

Production of biofuel includes cultivation of oleaginous microorganisms, which produce lipids similar to those of soybean. Microalgae contain high amount of lipids, making them an attractive source for biofuel production. 39 developed an interesting design of "double BC photobioreactor system", which utilized a mixed culture of microalga *Chlorella vulgaris* and yeast *Rhodotorula glutinis*. This system consisted of one BC divided into two parts using a polyester fabric filter. Fabric filter allows the transport of molecules and keeps cell cultures separated³⁹.

Another simpler approach is batch cultivation of just *C. vulgaris*. 40 cultivated *C. vulgaris* in small BC with different light sources in synthetic wastewater as a source of nutrients. Cells removed considerable amount of pollutants from water and produced

enough lipids, carbohydrates and proteins to be considered as potential source of biofuel⁴⁰. Complication in these cultivations is the necessity of a light sources, either natural or artificial. Locations with low amounts of natural sunlight will suffer from low productions due to insufficient amount of energy. Artificial light is possible solution for this problem, but it increases energy costs of the whole process.

Antibiotics

Antibiotics play a crucial role in our history and are important part of pharmaceutical industry. They are used in medicine, veterinary, farming and aquaculture. Considerable amount of antibiotics is not used just for medical purposes, but also as a growth stimulant to increase size of livestock, which is problematic in terms of antibiotic resistance⁴¹.

Antibiotics are usually produced in large-scale, substrate limited fed-batch cultivations under high cell concentrations to achieve higher productivities. The main producents are filamentous organisms such as *Penicillium*, which is utilized in penicillin production. Production of penicillin and other beta-lactams was one of the first large-scale production in modern era and the global demand is high even to this day. Combination of high cell density and filamentous cells drastically increases viscosity of liquid, which complicates homogenization in general. This can lead to imperfect mixing, which can threaten success of entire cultivation. The cultivation process is very sensitive to dissolved oxygen concentration⁴². Organisms utilized in antibiotic production are sensitive not just to agitation and oxygen supply, but they are also sensitive to nutrient transfer. Physiological reaction to these conditions varies between strands, which complicates design process in general. In addition, good knowledge of biochemical pathways is needed, mainly antibiotic structure and list of necessary precursors⁴³.

BCs are commonly used in antibiotic industry due to their gentle homogenization⁴⁴. 45 compared STR to BC in production of rentamycin by *Streptomyces olidensis*. Cells were immobilized and used in multiple cultivations in repeated batch system, where old medium was simply replaced by fresh. Their overall results suggest that STR has about three times higher productivity than BC, but it was long-term unstable. STR reached two to three batches, while BC reached twelve.

Conclusions

Bubble columns are simple and easy to build bioreactors, which require a smaller starting investment compared to STRs. In the case of BCs without the internals, they required less maintenance due to lack of complex mechanical parts. However, BCs are not as versatile as STRs and are much more situational. Even though, they are unreplaceable part of today's industry, especially in cultivations of shear sensitive cells in high volumes, like production of citric acid or antibiotics.

Direct comparison of BC and STR is difficult. Some studies have conducted tests with specific cultivations on minds. The final choice between these bioreactors depends on specific application, cell line used and final economics of the entire process.

References:

1. Spier MR, Vandenberghe L, et al.: *Bioreactors: Design, properties and applications* 53 (2011).
2. Cooney CL: *Science* 219(4585), 728 (1983).
3. Daneshvar E, Sik Ok Y, et al.: *Bioresour Technol* 329, 124870 (2021).
4. Durand A: *Biochem Eng J* 13(2-3), 113 (2003).
5. Garcia-Ochoa F and Gomez E: *Biotechnol Adv* 27(2), 153 (2009).
6. Allman T (2021). *5 Reasons to Move from Shake Flasks to a Bioreactor*, <https://www.infors-ht.com/en/blog/5-reasons-to-move-from-shake-flasks-to-a-bioreactor/>.
7. Stolp H and Starr MP (1981). *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*, pp. 135: Springer.
8. Gottschal J, Harder W, et al.: *Prokaryotes* 1,149 (1992).
9. Mores S, Vandenberghe LPS, et al.: *Bioresour Technol* 320(Pt B), 124426 (2021).
10. Feder J and Tolbert WR: *Scientific American* 248(1), 36 (1983).
11. Iamtham S and Sornchai P: *S Afr J Bot* 147, 840 (2022).
12. Garcia-Ochoa F, Gomez E, et al.: *Biochem Eng J* 49(3), 289 (2010).
13. Xing W, Yin M, et al. (2014). *Rotating Electrode Methods and Oxygen Reduction Electrocatalysts*, pp. 1.
14. Tilley DF: *Aerobic wastewater treatment processes*, IWA publishing (2011).
15. Sweere AP, Mesters JR, et al.: *Biotechnol Bioeng* 31(6), 567 (1988).
16. Gnoth S, Kuprijanov A, et al.: *Appl Microbiol Biotechnol* 85(4), 955 (2010).
17. Ahleboot Z, Khorshidtalab M, et al.: *Avicenna J Med Biotechnol* 13(3), 123 (2021).
18. Hoshan L, Jiang R, et al.: *Biotechnol Prog* 35(1), e2743 (2019).
19. Cardias BB, Morais MG, et al.: *Bioresour Technol* 267,77 (2018).
20. Ashok A, Doriya K, et al.: *Biocatal Agric Biotechnol* 9,11 (2017).
21. Ratledge C and Kristiansen B (2006). *Basic biotechnology*/edited by Colin Ratledge and Bjørn Kristiansen.
22. Karamerou EE and Webb C: *Biochem Eng J* 151((2019).
23. Liyanaarachchi VC, Premaratne M, et al.: *Algal Research* 57, 102353 (2021).
24. Mahvi A: *J Environ Health Sci Eng* 5, 79 (2008).
25. Duan Y, Zhu Z, et al.: *PLoS One* 6(5), e20265 (2011).
26. Oostlander PC, Van Houcke J, et al.: *Algal Res* 47, 101889 (2020).
27. Kwon S, Yoo IK, et al.: *Biotechnol Bioeng* 73(1), 25 (2001).
28. Garcia-Ochoa F, Santos VE, et al. (2011). *Comprehensive Biotechnology*, pp. 179.
29. Gogate PR, Beenackers AaCM, et al.: *Biochem Eng J* 6(2), 109 (2000).
30. Patra N and Srivastava AK: *Appl Biochem Biotechnol* 174(6), 2209 (2014).
31. Deckwer W-D and Field RW: *Bubble column reactors*, Wiley New York (1992).
32. Chisti Y and Moo-Young M (2003). *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)*, edited by R. A. Meyers, pp. 247. New York: Academic Press.
33. Ruzicka MC, Zahradník J, et al.: *Chem Eng Sci* 56(15), 4609 (2001).
34. Basha OM and Morsi BI: *Int J Chem React Eng* 16(3), 20170058 (2018).
35. Vandenberghe LPS, Rodrigues C, et al. (2017). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, pp. 557.
36. Papagianni M, Mattey M, et al.: *Enzyme Microb Technol* 25(8-9), 710 (1999).
37. Anastassiadis S, Morgunov IG, et al.: *Recent pat biotechnol* 2(2), 107 (2008).
38. Demirbas A: *Energy Convers Manag* 49(8), 2106 (2008).
39. Zhang Z, Ji H, et al.: *Bioresour Technol* 164, 93 (2014).
40. Dhanasekar S and Sathyanathan R: *Glob J Environ Sci* 9(4), 789 (2023).
41. Meek RW, Vyas H, et al.: *PLoS Biol* 13(10), e1002266 (2015).
42. De Jonge LP, Buijs NA, et al.: *Biotechnol J* 6(8), 944 (2011).
43. Olmos E, Mehmood N, et al.: *Bioprocess Biosyst Eng* 36(3), 259 (2013).
44. Kantarci N, Borak F, et al.: *Process Biochem* 40(7), 2263 (2005).
45. Pinheiro IR and Facciotti MCR: *Process Biochem* 43(6), 661 (2008).

Summary

Terentyak M., Sýkora V., Zedníková M.: Cultivation of microorganisms in bioreactors

Industrial cultivations are a key source of many products. Each cultivation requires a specific producing organism, conditions and apparatus. Stirred tanks are most commonly used bioreactors, due to their efficient homogenization and versatility. However, they are not entirely suitable for cultivation of shear sensitive cells. Bubble columns are more suitable option for shear sensitive cells. Overall comparison of bubble columns and stirred tanks is complicated, since every cultivation is situational.

Bubble columns are simple and easy to build bioreactors, which require a smaller starting investment compared to STRs. In the case of BCs without the internals, they required less maintenance due to lack of complex mechanical parts. However, BCs are not as versatile as STRs and are much more situational. Even though, they are unreplaceable part of today's industry, especially in cultivations of shear sensitive cells in high volumes, like production of citric acid or antibiotics.

Direct comparison of BC and STR is difficult. Some studies have conducted tests with specific cultivations on minds. Still, the final choice between these bioreactors depends on application, cell line used and final economics of the entire process.

Keywords: bioreactor, bubble column, stirred tank, cultivation

Souhrn

Terentyak M., Sýkora V., Zedníková M.: Kultivace mikroorganismů v bioreaktorech

Průmyslové kultivace jsou klíčovým zdroje mnoha produktů. Každá kultivace má své vlastní produkční kmeny, podmínky a aparatury. Nejčastěji používané jsou mechanicky míchané bioreaktory, díky jejich efektivní homogenizaci a všestrannosti. Přesto nejsou kompletně kompatibilní s organismy citlivými na střížné síly. Pro kultivaci takových organismů je vhodnější probublávaná kolona. Obecné porovnání probublávané kolony s míchaným bioreaktorem je náročné, jelikož je každá kultivace specifická.

Probublávané kolony jsou jednoduché a snadno konstruovatelné bioreaktory, které vyžadují menší počáteční kapitál v porovnání s mechanicky míchaným bioreaktorem. Probublávané kolony nemají vnitřní komponenty a složité mechanické části a jsou proto méně náročné na údržbu. Nicméně, nejsou tak všestranné jako míchané bioreaktory a jsou mnohem více účelově používány. Přesto jsou v dnešním průmyslu nenahraditelné, především při velkoobjemových kultivacích mechanicky citlivých buněk, jako produkce kyseliny citrónové nebo antibiotik.

Přímé porovnání probublávané kolony s mechanicky míchaným bioreaktorem je složité. Existují studie zaměřené na porovnání těchto bioreaktorů při specifických kultivacích. Volba mezi těmito bioreaktory přesto závisí na dané aplikaci, buněčné linii a ekonomice celého procesu.

Klíčová slova: bioreaktor, probublávaná kolona, mechanicky míchaný bioreaktor, kultivace

OBSAH

Úvod	45
Čermáková E., Zdeňková K.: PCR a LAMP: užitečné nástroje pro autentizaci ryb	46
Šárka E., Smrčková P.: Škrob – biosyntéza, nutriční vlastnosti, biotechnologie, enzymové metody stanovení jednotlivých forem	50
Terentyak M., Sýkora V., Zedníková M.: Cultivation of microorganisms in bioreactors	57

CONTENT

Editorial	45
Čermáková E., Zdeňková K.: PCR and LAMP: useful tools for authenticating fish	46
Šárka E., Smrčková P.: Starch – biosynthesis, nutritional properties, biotechnologies, enzyme methods for determination of its individual forms	50
Terentyak M., Sýkora V., Zedníková M.: Kultivace mikroorganismů v bioreaktorech	57

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albertrtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers. In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nekládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

Tiskne:
VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737 (Print)
ISSN 2570-8910 (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).