

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Využití kvasinek pro průmyslové účely

Bakalářská práce

Daniel Drholec

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Ing. Eva Popelářová, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Využití kvasinek pro průmyslové účely" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.4. 2022

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Evě Popelářové, Ph.D. za odborný dohled, rady a cenné připomínky a vedení při sepisování bakalářské práce.

Využití kvasinek pro průmyslové účely

Souhrn

Kvasinky jsou hojně využívanými zástupci mikroorganismů, které našly uplatnění ve velmi širokém spektru průmyslových odvětví. Nejdříve se kvasinky začaly cíleně používat k výrobě potravin a nápojů, kde důkazy potvrzují jejich použití již několik tisíc let před naším letopočtem. Také proto se jedná o jeden z nejvíce využívaných mikroorganismů ve výrobě potravin. Již desítky let se kvasinky neuvžívají jen na poli tradičních potravinářských výrob, jako jsou fermentační procesy spojené s produkcí alkoholických nápojů, lihu či pekárenství. Naopak se odvětví jejich využití v technologické praxi rozšířilo i na farmacii, chemický průmysl, produkci biopaliv a biomasy. Výzkum a vývoj využití kvasinek v těchto a dalších průmyslových oblastech pokračuje neustále a kvasinky se stávají surovinou pro výrobu celé řady chemických látek. Kvasinky se začínají používat jako surovina pro výrobu jako jsou proteiny nebo biopaliva, jiné se používají pro přípravu léčiv nebo jako probiotika. Celá řada kvasinek tedy našla využití při produkci různých druhů organických látek. Jako příklady, které se již uplatnily i v průmyslovém měřítku mohou sloužit produkce kyseliny mléčné nebo kyseliny citronové. Lze předpokládat, že se využití kvasinek a to nejen *Saccharomyces cerevisiae* bude neustále rozšiřovat a jejich význam v mnoha odvětvích poroste.

Kvasinky jsou také jedny z nejlépe zmapovaných mikroorganismů, zvláště pak *Saccharomyces cerevisiae*, a proto se používají, jako modelové organismy ve výzkumu na poli genetického inženýrství. Biotechnologie, do kterých spadá i metabolická produkce kvasinek, jsou velmi všestranný a flexibilní obor z hlediska využitelnosti v procesní praxi. Proto jsou považovány za klíč k udržitelnému chemickému a farmaceutickému průmyslu v budoucnu. Biotechnologie tak nabízí zcela nové příležitosti produkce nám již známých, či nových produktů. Jejich největší výhodou jsou nižší teploty vedení biosyntéz a menší znečištění prostředí oproti konvenčně využívaným technologiím v chemickém průmyslu. V práci jsou popsány jak tradiční postupy použití kvasinek v potravinářském průmyslu, tak nové postupy využívané v chemickém průmyslu nebo farmacii.

Klíčová slova: *Saccharomyces*; alkoholové kvašení; metabolismus; fermentace; biotechnologie.

Use of yeast for industrial purposes

Summary

Yeasts are widely used representatives of micro-organisms that have found application in a very wide range of industries. First, yeasts began to be used specifically for food and beverage production, where evidence confirms their use as early as several thousand years BC. This is also why it is one of the most used micro-organisms in food production. For decades, yeasts have not only been used in traditional food production fields, such as fermentation processes associated with the production of alcoholic beverages, alcohol or bakery. On the contrary, the sector of their use in technological practice has also extended to pharmacy, the chemical industry, biofuel production and biomass. Research and development of the use of yeasts in these and other industrial areas continues continuously and yeasts become raw materials for the production of a wide range of chemicals. Yeasts are starting to be used as raw materials for production, such as proteins or biofuels, while others are, used for the preparation of pharmaceuticals or as probiotics. A number of yeasts have therefore found use in the production of various types of organic substances. The production of lactic acid or citric acid can serve as examples that have already been applied on an industrial scale. It can be assumed that the use of yeasts, and not only *Saccharomyces cerevisiae*, will continue to expand and their importance in many sectors will increase.

Yeasts are also one of the best mapped micro-organisms, especially *Saccharomyces cerevisiae* and therefore they are, used as model organisms in research in the field of genetic engineering. Biotechnology, which includes metabolic yeast production, is a very versatile and flexible field in terms of usability in process practice. It is therefore considered to be the key to a sustainable chemical and pharmaceutical industry in the future. Biotechnology thus offers completely new production opportunities for products already known to us or for new products. Their biggest advantage is lower temperatures of biosynthesis lines and less environmental pollution compared to conventionally used technologies in the chemical industry. The work describes both traditional processes of yeast use in the food industry and new processes used in the chemical industry or pharmacy.

Keywords: *Saccharomyces*, alcoholic fermentation, metabolism, fermentation, biotechnology.

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíle práce	8
3 Kvasinky	9
3.1 Charakteristika mikroorganismu.....	9
3.1.1 Taxonomie kvasinek	9
3.1.2 Morfologie kvasinek	9
3.1.3 Cytologie a složení buňky kvasinky.....	11
3.2 Metabolismus a metabolická produkce kvasinek.....	12
3.2.1 Metabolismus kvasinek	13
3.2.2 Aerobní metabolismus.....	13
3.2.3 Anaerobní metabolismus.....	13
3.2.4 Metody modifikace látkové přeměny kvasinek.....	14
3.3 Využití kvasinek v průmyslu	15
3.4 Potravinářský průmysl	15
3.4.1 Pivovarské kvasinky	16
3.4.1.1 Moderní technologie výroby piva.....	17
3.4.1.2 Kulturní pivovarské kvasinky	17
3.4.1.3 Propagace pivovarských kvasinek.....	18
3.4.1.4 Stresové faktory v technologickém procesu výroby.....	18
3.4.1.5 Vliv kvasinek na sensorické vlastnosti piva.....	19
3.4.2 Lihovarské kvasinky	20
3.4.3 Vinařské kvasinky.....	20
3.4.4 Pekárenské kvasinky	21
3.4.4.1 Technologie výroby droždí.....	21
3.4.5 Produkce proteinu	23
3.5 Chemický průmysl.....	24
3.5.1 Produkce kyselin	26
3.5.2 Produkce bioethanolu	27
3.5.3 Produkce isobuthanolu.....	29
3.6 Farmacie.....	30
4 Závěr	33
5 Literatura	34

1 Úvod

Historie a vývoj lidstva je spojený s výrobou a úchovou potravin. Mezi první metody přípravy a úchovy potravin lze zařadit i procesy spojené s využitím kvasinek. Mezi procesy přípravy potravin, kde kvasinky hrají významnou roli, lze zařadit například výrobu chleba, vína, piva, ale i sýrů nebo masných výrobků. Znalosti a dovednosti spojené s výrobou fermentovaných potravin se neustále zdokonalují. Díky těmto znalostem a neustálému vývoji nalézají kvasinky uplatnění i v dalších oborech a odvětvích lidské činnosti. Již několik desetiletí se kvasinky uplatňují nejen při výrobě potravin, ale i v dalších průmyslových odvětvích. Vývoj v biotechnologiích, bioinženýrství a genetice pomohl rozšířit jejich využití také v zemědělství, ekologii, chemickém nebo farmaceutickém průmyslu. V zemědělství se podílejí na výrobě krmiv, v chemickém průmyslu slouží k přípravě biopaliv, průmyslových enzymů a metabolitů s nízkou molekulovou hmotností. Ve farmaceutickém průmyslu jsou již nyní využívány k produkci proteinových léčiv, nebo jako probiotika. Ve všech těchto odvětvích dochází k neustálému vývoji, který napomáhá také rozšíření využívání kvasinek i v dalších odvětvích. Kvasinky mají také velmi důležitou roli v zemědělství a ekologii, a to jako činitelé biologické kontroly, bioremediace a jako indikátory kvality životního prostředí. Všechna tato odvětví patří mezi tradiční nebo moderní biotechnologie, v nich kvasinky mají nepostradatelnou roli a jejich význam bude s důrazem na udržitelnost a minimalizaci dopadů lidské činnosti na životní prostředí neustále stoupat. Bez nadsázky lze konstatovat, že kvasinky mají v biotechnologiích a dalších oborech lidské činnosti za sebou bohatou historii a před sebou světlou budoucnost.

2 Cíle práce

Kvasinky provázejí lidskou populaci od nepaměti, jsou nedílnou součástí našeho života. Jejich činnost je člověkem používána k výrobě nebo zpracování různých produktů. Mezi oblasti, kde jsou tyto mikroorganismy využívány, patří zejména potravinářský, farmaceutický a chemický průmysl.

Cílem bakalářské práce byla charakteristika významných kvasinek, které jsou využívány ve vybraných průmyslových odvětvích. Dalším úkolem byl popis jejich funkce během procesů výroby, včetně průběhu jejich metabolismu a možnosti jeho ovlivnění.

3 Kvasinky

Mikroorganismy dle základního členění dělíme na prokaryotické a eukaryotické podle toho, zda jejich buněčná struktura obsahuje buněčnou membránu a membránové obaly organel či nikoliv. Kvasinky, které patří mezi nejběžnější mikroorganismy, jsou první zástupci eukaryotických buněk, to znamená, že většina buněčných struktur již odpovídá eukaryotické buňce. Kvasinky jsou jednobuněčné nebo vláknité heterotrofní mikroorganismy, které se množí pučením či příčným dělením. Jejich metabolická činnost nezahrnuje fotosyntézu. Jejich struktura obsahuje odolnou buněčnou stěnu (Mattanovich et al. 2014).

3.1 Charakteristika mikroorganismu

Kvasinky jsou technologicky významnou skupinou jednobuněčných hub, které našly uplatnění ve mnoha průmyslových odvětvích. Zprvu se kvasinky začaly cíleně používat k výrobě nápojů, poté i dalších potravin, kde důkazy potvrzují jejich použití již několik tisíc let před naším letopočtem. Také proto se jedná o jeden z nejvíce využívaných mikroorganismů ve výrobě potravin (LEGRAS et al. 2007).

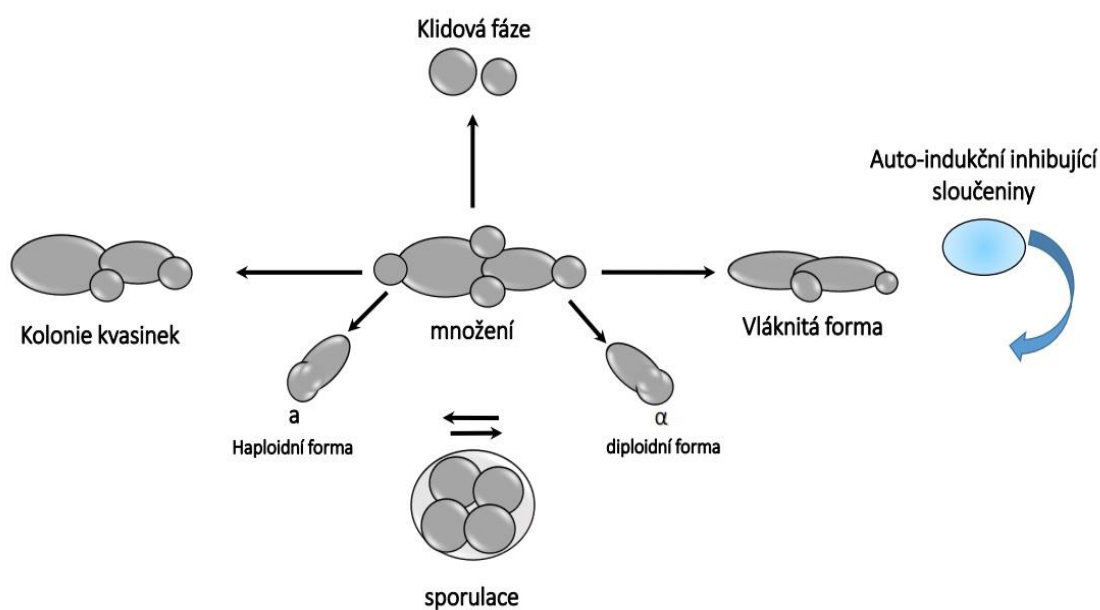
3.1.1 Taxonomie kvasinek

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, které řadíme do říše hub, superskupiny Opisthokonta a domény Eukarya. Netvoří ale žádnou nativní taxonomickou skupinu, proto není možné je zcela a jednoznačně definovat. Dle způsobu množení kvasinky členíme do tří hlavních skupin. První skupinou jsou rody kvasinek tvořící askospory – *Ascomycotina*, třídy Hemiascomycetes, řádu Endomycetales. Mezi technologicky významné kvasinky z rodu *Ascomycotina* patří například rody: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* či *Yarrowia*. Druhou skupinou jsou kvasinky tvořící buď bazidiospory nebo sporidie a heterokaryotní mycelium s přezkami, tedy *Basidiomycotina*. Do druhé skupiny řadíme např. *Filobasidium* či *Sporidiobolus*. Třetí skupinou jsou rody, u nichž není známa tvorba pohlavních spor, a jsou řazeny do *Deuteromycotina*. Nejvýznamnější a nejrozšířenější rod třetí skupiny jsou kvasinky rodu *Candida*, který obsahuje 160 druhů. Dále do *Deuteromycotina* spadá kupříkladu *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Malassezia* nebo *Trichosporon* (Šilhánková 2008).

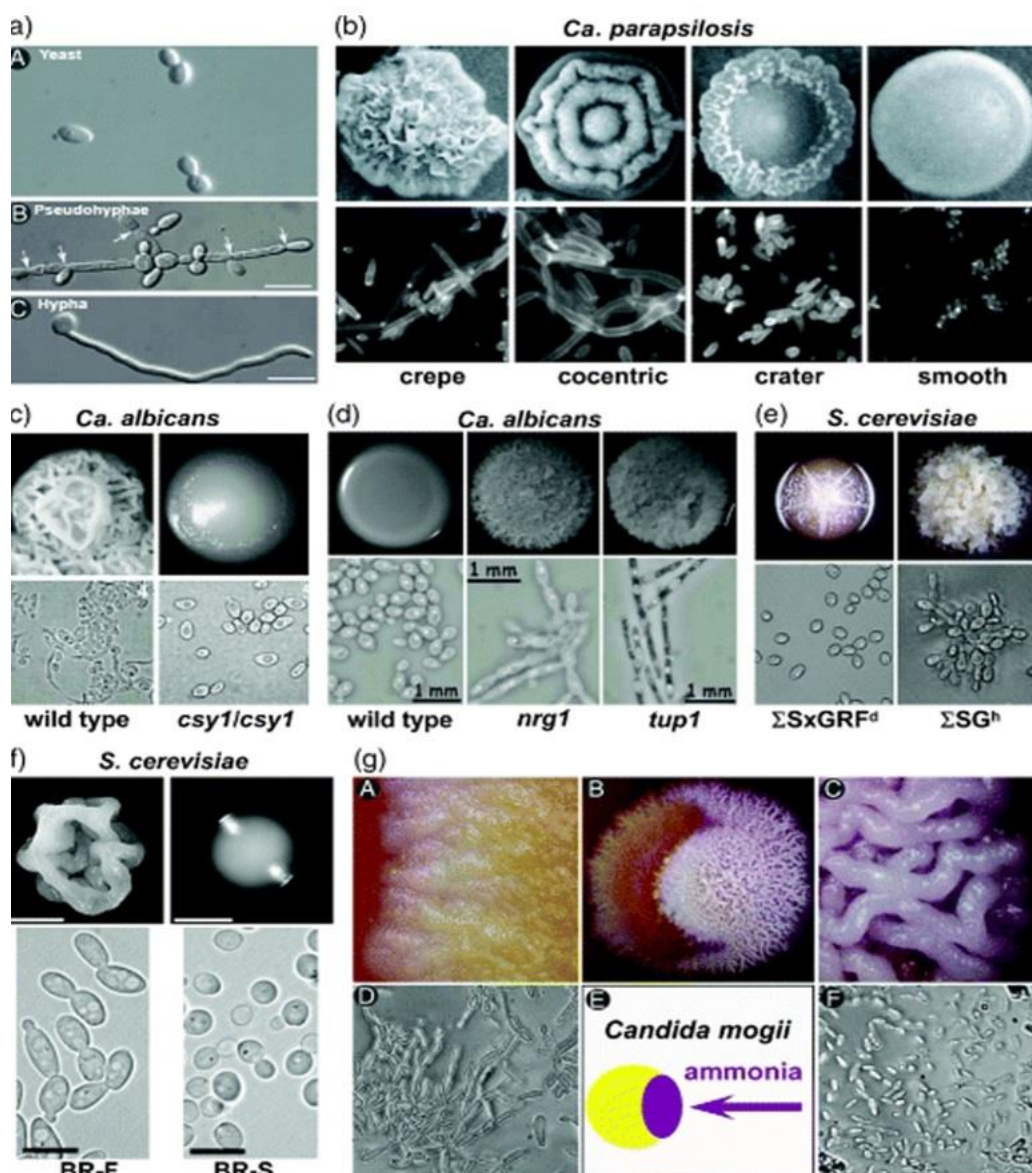
3.1.2 Morfologie kvasinek

Velikostně se pohybují buňky jednotlivých rodů kvasinek v rozmezí od 3 – 15 μm. Samotný tvar buněk je dán rodovou příslušností mikroorganismu, kultivačními podmínkami či životním cyklem buněk kvasinek. Kvasinky se mohou diferenciovat v morfologii buněčného tvaru v závislosti na způsobu jejich reprodukce. Mohou být sféroidní, subglobální, elipsoidní, vejčité, protáhlé, tvaru půlměsíce či trojúhelníkového tvaru (*Trigonopsis*). Pro jednotlivé kultury kvasinek je typický jejich buněčný tvar (Kreger-Van Rij 1984).

Životní cyklus kvasinek je komplexní a zahrnuje četná buněčná stádia o mnoha tvarech a formách buněk (Mishra et al. 2022). Další důležitou schopností kvasinek je též tvorba biofilmů a mycelií. Přičemž dochází během tvorby biofilmu a mycelií k značným rozdílům v uspořádání či vzhledu kolonií mezi divokými kmeny a kulturními mikroorganismy (viz. Obr. 2). Přeměnu buněčných struktur v mycelia mohou ovlivnit různé faktory, jako pH, teplota, obsah živin v mediu, množství přechodných kovů či chelatační činidla (Sun et al. 2021). Kvasinky jsou schopny, stejně tak, jako i jiné druhy hub během svého životního cyklu přecházet mezi formou koloniální (prstencový biofilm) a vláknitou (viz. Obr. 2). Přejít mezi životními cykly je znázorněn na obrázku číslo 1. Jeden z hlavních faktorů při započatí tvorby vláknité formy je pro kvasinky nedostatek zdrojů uhlíku nebo jiný limitní faktor v prostředí (Cullen & Sprague 2012).



Obr. 1: Životní cyklus pučících buněk kvasinek (Cullen & Sprague 2012, upraveno)



Obr. 2: Rozdílná morfologie kulturních a divokých druhů kvasinek (Palková & Váchová 2006)

3.1.3 Cytologie a složení buňky kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné nebo vláknité heterotrofní mikroorganismy, které se množí pučením či příčným dělením. Jejich metabolická činnost nezahrnuje fotosyntézu. Jejich struktura obsahuje odolnou buněčnou stěnu a některé rody tvoří i buněčné pouzdro. Pouzdro i buněčná stěna jsou membránové obaly zastávající řadu funkcí. Zatímco bakteriální buněčná stěna obsahuje převážně peptidoglykany, buněčná stěna kvasinek je více komplexní, skládá se z β -(1 \rightarrow 3)-glukanů a z části z β -(1 \rightarrow 6)-glukanů a chitinu (Lozančić et al. 2021).

Buněčná stěna obsahuje 29-64 % β -glukanů, 31 % mannanů, 13 % proteinů, 9 % lipidů a 1-2 % chitinu. Neaktivnější komponenty stěny jsou však β -glukany a manany (manoproteiny). Dřívější studie objevily, že tyto látky buněčných stěn kvasinek mohou hrát roli v interakci s makrofágy a napomoci přirozené imunitě lidského těla a jiných savců (Liu et al. 2021). To udává nový směr v řešení dlouhodobého problému s rezistencí mikrobiální vůči antibiotikům. Velikostně se buněčná stěna pohybuje v rozmezí 100-400 nm. Dále má kvasničná buněčná stěna čtyři základní funkce: Stabilizace intracelulárního osmotického tlaku, ochrana před stresem fyzikálních podmínek, zachování tvaru buňky, což udává predispozici k morfogenezi buňky a jako zdroj proteinu k další syntéze (Klis et al. 2006).

Buňky kvasinek jsou složeny největší částí z vody a makro-biogenních prvků (C, H, N, O, P), které v buňkách utváří složitější struktury polymerního charakteru, jako bílkoviny, tuky, glykoproteiny atd. Zastoupení jednotlivých substancí z chemického hlediska v buňce je odvislé od rodové příslušnosti kvasinky a stáří dané kultury. Voda utváří v buňce majoritní část, a to 65-80 %. V sušině *Saccharomyces cerevisiae* je obvyklý poměr základních organických substancí: dusíkaté látky 45-60 %, cukry 15-37 %, lipidy 2-12 %, minerálie 6-12 %, při čemž mezi další obsahové látky sušiny lze řadit vitaminy a jiné růstové látky. V buňkách dále nalezneme i nemalé množství volných aminokyselin (převážně ve vakuolách), (Kopecká et al. 2012).

3.2 Metabolismus a metabolická produkce kvasinek

Metabolismem rozumíme látkovou přeměnu vstupního substrátu (zdroje uhlíku), který je kvasinka enzymaticky schopna přeměnit na jednodušší molekuly či jiné degradační produkty. Dochází k rozkladu molekul za uvolnění energie a dalších produktů. Tato energie a produkty rozkladných reakcí jsou dále využity kvasinkami pro jejich záchovu, růst a množení. Intenzita metabolismu je ovlivněná rodovou příslušností kvasinek, a to enzymatickou výbavou a optimálními kultivačními podmínkami mikroorganismu. Intenzita metabolických procesů je pak zejména ovlivněná teplotou prostředí, pH, koncentrací substrátu v prostředí a redox. potenciálem. Výsledné produkty metabolických drah jsou ovlivněny u kvasinek především přístupem kyslíku v prostředí. Rozlišujeme tedy aerobní a anaerobní formu metabolických drah. Cílenými produkty jednotlivých průmyslových výrob jsou pak alkoholy, organické kyseliny, samotné enzymy, bioaktivní látky nebo samotná biomasa kulturních kvasinek (Saxena 2015).

3.2.1 Metabolismus kvasinek

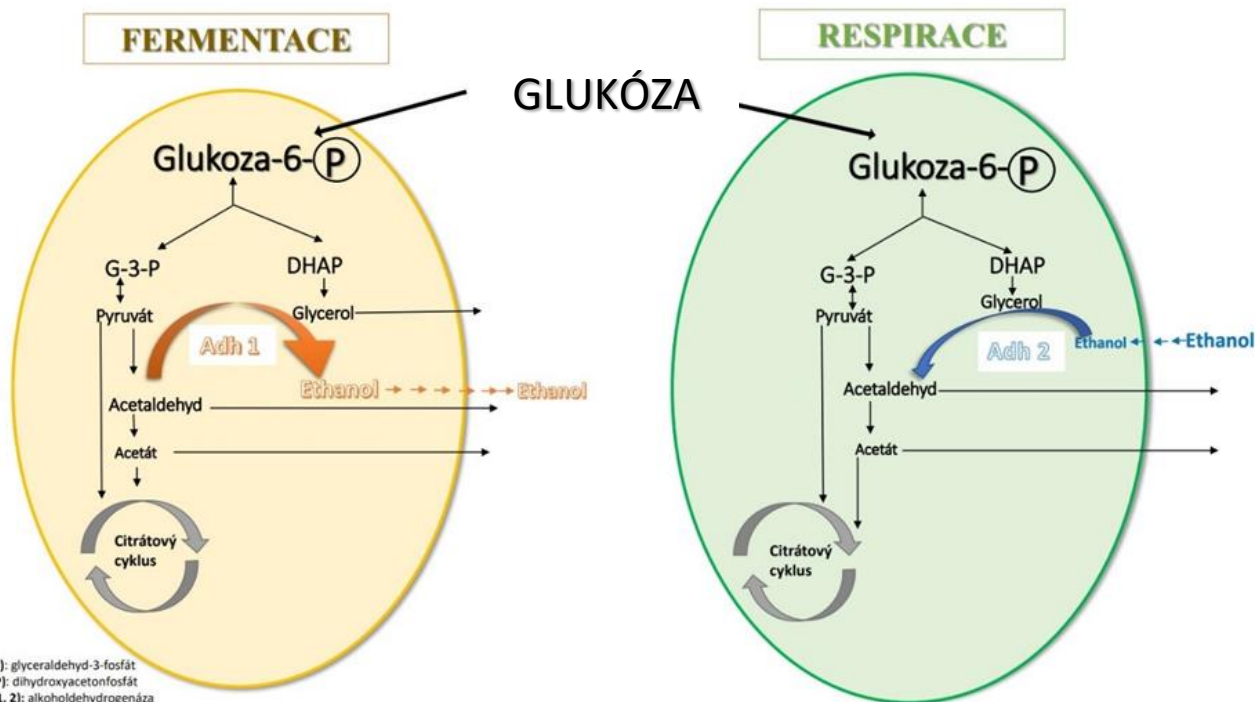
Kvasinky preferují, jako zdroj uhlíku jednoduché monosacharidy a disacharidy. Oligosacharidy a polysacharidy méně. To, jaký substrát je kvasinka schopna rozkládat, je nejvíce ovlivněno enzymatickou výbavou mikroorganismu. Za aerobních podmínek kvasinky energii získávají skrze respiraci, která zahrnuje rozsáhlé spektrum řetězových reakcí. Metabolická přeměna za aerobních podmínek je pro kvasinky sice energeticky výhodnější, ale není tak zásadní pro průmyslovou výrobu, jako metabolická přeměna za anaerobních podmínek, tedy fermentaci. V průběhu respiračního i fermentativního metabolismu glykolytickým štěpením vzniká z 3-fosfoglycerátu při odštěpení fosforylové skupiny (která je následně převedena do formy ADP) pyruvát, jakožto hlavní metabolit sacharidů. Následné procesy a štěpení se již liší podle toho, zda je přítomen kyslík, či nikoli. Dále metabolické dráhy dělíme na katabolické a anabolické procesy. Při katabolismu dochází k rozkladu substrátu v kultivačním mediu a energie se uvolňuje, zatímco při anabolismu se tato energie spotřebovává k syntéze složitějších molekul a dalších struktur důležitých pro kvasinku za spotřeby energie (Vodrážka 1992).

3.2.2 Aerobní metabolismus

K zisku energie kvasinky využívají obě formy metabolických drah, respirační i fermentativní. Jejich schéma je popsáno na obrázku číslo 2 (Sicard & Legras 2011). Respirační forma, ale kvasince generuje téměř 10krát více ATP na 1 molekulu glukózy a má pětinasobně vyšší nárůst biomasy (Nilsson & Nielsen 2016). Během aerobní respirace kvasinek dochází k oxidaci substrátu přes jednotlivé oxidační stupně a řetězové reakce až na CO_2 a H_2O se ziskem kýžené energie. V respiračním řetězci reakcí vzniká pyruvát, který je transformován pyruvát dehydrogenázou na acetyl CoA, který se oxiduje v citrátovém cyklu na CO_2 za vzniku redukovaných forem koenzymů (GTP, NADH^+), a ty se následně oxidují v mitochondriích na ATP (Pfeiffer & Morley 2014).

3.2.3 Anaerobní metabolismus

Anaerobní metabolismus – fermentace, probíhá přímo v cytoplasmě jednotlivých buněčných struktur díky enzymatické činnosti, která katalyzuje jednotlivé reakce. Při absenci kyslíku nedochází k dokončení dýchacího řetězce s produkcí NADH^+ , ale zastavuje se na vzniku pyruvátu. Buňka pomocí pyruvát dekarboxylázy mění pyruvát na acetaldehyd za produkce CO_2 . Díky nedostatku kyslíku se nahromaděné NADH^+ nemůže reoxidovat zpět do formy NAD^+ ani být zapojeno v citrátovém cyklu. Jedinou možností je následná reakce alkoholdehydrogenázy s acetaldehydem za vzniku ethanolu a reoxidované formy NAD^+ (Renneberg et al. 2017).



Obr. 2: Schéma fermentace a respirace (Sicard & Legras 2011, upraveno)

3.2.4 Metody modifikace látkové přeměny kvasinek

K porozumění buněčnému metabolismu, jeho modifikaci a užití v průmyslové výrobě nám dnes napomáhají biotechnologie a bioinženýrství. Mezi tyto metody lze řadit: sekvenování genomu daného organismu, měření genové transkripce, či detekce množství specifických bílkovin v substrátu, nebo produktu biotechnologie (Winter & Krömer 2013). Metabolická produkce kvasinky je nejvíce ovlivněna její rodovou příslušností a enzymatickou výbavou. Průběh metabolismu lze tedy ovlivňovat řízenou kultivací a separací žádané kultury kvasinek. Dále pak užíváme metod genetického inženýrství. Kvasinky jsou jedny z nejlépe zmapovaných mikroorganismů, a proto se používají, jako modelové organismy ve výzkumu na poli genetického inženýrství (van Aalst et al. 2022).

Mezi biotechnologické metody modifikace kvasinek patří regulace stability mRNA kvasinky, což má za následek ovlivnění tvorby enzymů a tím pádem i jejího metabolismu. Další metodou je alosterická regulace enzymatické činnosti kvasinek, ke které dochází navázáním specifických inhibitorů v aktivních částech enzymů kvasinek. Dále je užíváno syntézy proteinů, které ovlivňují posttranslační změny mikroorganismu, čímž dochází k regulaci enzymatické činnosti a syntézy dalších látek (Nandy & Srivastava 2018).

3.3 Využití kvasinek v průmyslu

Kvasinky jsou hojně využívány ve velmi širokém spektru průmyslových odvětví. Jedná se o jeden z nejvíce využívaných mikroorganismů ve výrobě vůbec. Kvasinky jsou užívány v potravinářských výroбах, farmacii, výrobě bioethanolu, lihovarství, syntéze biologicky aktivních látek, enzymů atd. V případě *S. cerevisie* se jedná o jeden z doposud nejvíce prostudovaných mikroorganismů. Zároveň *Saccharomyces cerevisiae* byla prvním mikroorganismem s rozklíčovanou celou genetickou informací. Největší zastoupení mají však kvasinky stále v tradičních potravinářských výroбах. Kvasinky by mohly být právem označovány za nejstarší cíleně užívané mikroorganismy. Dle archeologů byly v Číně nalezeny důkazy o výrobě fermentovaného nápoje, které sahají až do doby 7000 let před naším letopočtem (LEGRAS et al. 2007). Díky dnešním možnostem v oblasti genetického inženýrství, biochemie a modifikace metabolismu jednotlivých mikroorganismů včetně kvasinek se jejich pole působnosti v budoucnu jistě ještě více rozšíří (García-Garibay et al. 2014).

3.4 Potravinářský průmysl

Kvasinky mají v potravinářství nezastupitelnou roli, a to v mnoha odvětvích. Především díky své specifické metabolické činnosti. V technologickém procesu pak záleží, jaký je cílený produkt výroby. Od toho se dále odvíjí podmínky působení či použitá kultura kvasinek. Kvasná mikrobiota hraje též důležitou roli v rozvoji specifických sensorických vlastností finálních výrobků, díky produkci mnoha enzymů a metabolit během fermentace a dozrávání. Přehled vybraných potravinářských oborů, ve kterých se využívají kvasinky, můžeme vidět na obrázku číslo 3 (Copetti, 2019). Produkty vycházející z metabolické aktivity kvasinek nezahrnují pouze tradiční výrobky jako chléb nebo víno, nýbrž i například čokoládu, kávu a velké spektrum dalších výrobků (Gibson et al. 2017).



Obr. 3: Přehled vybraných odvětví potravinářství (Copetti 2019, upraveno)

3.4.1 Pivovarské kvasinky

Technologie výroby piva je jedna z nejstarších potravinářských výrob. Kvasinky jsou užívány k fermentaci tzv. mladiny, ze které v další fázi výroby, vzniká „mladé pivo“ a následně i výsledný produkt. Rozeznáváme mnoho pivních stylů a technologií výroby piv. Obecně se pojmem pivo rozumí fermentované nápoje s obilnou složkou, obohacením o chmelové produkty a obsahem jednodušších sacharidů a dalších organických látek. Za názvy, jako Ale, ležák, porter, stout, lambic, waisse a mnoho dalších se skrývá souhrnný výraz pivo. Jednotlivé specifické druhy piv se poté mohou lišit, jak použitou technologií výroby, tak rozdíly v sensorických a dalších parametrech daného druhu. Od barvy, nasycení CO₂ či hořkosti až po obsah alkoholu (Iattici et al. 2020). Mezi celosvětově nejvíce konzumované typy pak patří ležák plzeňského typu a piva typu Ale. Přesto je základní členění rozděleno na dva hlavní typy kulturních pivovarských kvasinek. Kvasinky spodního kvašení – *Saccharomyces pastorianus* a svrchního kvašení – *S. cerevisiae*. Oba typy kvašení jsou specifické pro rozdíly ve finálním výrobku a použité technologii (Basso et al. 2016).

3.4.1.1 Moderní technologie výroby piva

Během první části výroby piva vzniká tzv. mladina. V této fázi výroby se mísí voda s našrotovaným sladem (vystírání). Za stálého míchání v nerezových nádobách a postupného zvyšování teplot kádě dochází k enzymatické degradaci škrobu (zcukření), který je obsažen v sladu na nižší zkvasitelné sacharidy. K tomuto jevu dochází díky faktu, že slad má zvýšenou enzymatickou aktivitu. Voda obohacená o extraktivní látky ze sladu (sladina) se filtruje přes nerezová síta – proces zvaný scezování. Po scezení sladiny se meziproduct zahřívá do 100-102 °C po dobu 90 minut za postupného přidávání chmelových výrobků (chmelovar). Po dokončení chmelovaru se mladina přečerpává do kádě, kde se odstředivě míchá a rozvařené zbytky chmele sedimentují od tekutiny (Novotný 2019).

Následně se mladina provzdušní sterilním vzduchem a přečerpává přes deskový chladič („spílá“ – odvozeno od technologického názvu spilka) do kvasných kádí nebo cylindrokonických tanků za přidání kvasinek. Tzv. zákvasná teplota činí 8-10 °C. Dále se meziproduct označuje již za mladé pivo. Hlavní kvašení probíhá za anaerobních podmínek v otevřených kádích či CK tancích po dobu 3–6 dní při teplotách 8-15 °C. Po dokončení hlavního kvašení se mladé pivo oddělí téměř od všech kvasnic. K dobrému oddělení kvasinek od mladého piva napomáhá jev zvaný flokulace. Flokulace je shlukování kvasinek, kdy se kvasinky formují díky specifické buněčné stěně.

Buď sedimentují na dno kvasných nádob, nebo se drží na povrchu tekutiny, podle toho, zda jsou spodního nebo svrchního kvašení (Vidgren & Londesborough 2011). Poté je mladé pivo přečerpáno do ležáckých tanků, kde dokváší za sníženého tlaku několik týdnů (Zarnkow 2014).

Po dokončení ležení v tancích se pivo dle dostupné technologie pivovaru stabilizuje. Je žádoucí oddělit veškeré zbytky kvasinek a biomasu od hotového produktu za účelem zvýšení doby údržnosti výrobku. Lze použít membránovou filtraci s póry menšími než 0,2 µm. Dále je často ve velkých podnicích využívána tepelná pasterace, která může mít zhoršující vliv na organoleptické vlastnosti piva, proto jsou vyvíjeny snahy o nahrazení starých metod novými, jako užití ultrazvuku, vysokého tlaku či pulzního magnetického pole (Peña-Gómez et al. 2020).

3.4.1.2 Kulturní pivovarské kvasinky

Kmeny pivovarských kvasinek jsou charakteristické svou polyploidii (tři a více chromosomových sad v buňce), nejčastěji se jedná o tetraploidii či aneuploidii (nevyrovnaný počet chromosomů). Kulturní kmeny se liší i makroskopickými znaky v jejich morfologii kolonií (viz. Obr. 2). Podle výsledků molekulárně-genetických rozborů se dělí *S. pastorianus* do dvou skupin. Těmi jsou Saaz a Frohberg. Kvasinky skupiny Saaz jsou nasazované při výrobě piv plzeňského typu, součástí skupiny jsou i kmeny pivovaru Carlsberg (Dánsko).

Skupina Froberg zahrnuje kmeny holandské (Heineken), dánské (krom těch ze skupiny Saaz) a kupříkladu kmen Weihenstephan – W34/70. Tyto kmeny jsou uzpůsobeny k podmínkám fermentace při nižších teplotách (8-14 °C) a jako svůj substrát používají cukr melibiosu. Kdežto kvasinky *S. cerevisiae* se užívají k výrobě piv svrchně kvašených (např. IPA, APA, NEW ENGLAND IPA, pšeničná piva či stout) a melibiosu nemetabolizují. Navíc kvasinky svrchního kvašení fermentují při vyšších teplotách 18-24 °C (Krescanková et al. 2015).

3.4.1.3 Propagace pivovarských kvasinek

První izolování čisté pivovarské kultury provedl Emil Cristian Hansen roku 1883 v Carlsbergu. Od té doby se přesunula pozornost na další aspekty technologie propagace pivovarských kulturních kvasinek, jako jsou stresové faktory kvasinek a snaha o jejich minimalizaci. Jedná se o faktory, jako odstředivé síly, zvyšující se tlak, oxidační stres nebo teplotní šok (Nielsens 2010). Pivovary používají kvasinky, které jsou buď distribuovány, nebo si je sám propaguje, podle svých finančních i technologických možností. Dá se říci, že v pivovarech s vysokým objemem výroby si podnik množí kvasinky sám, kvůli snížení vstupních nákladů a zjednodušení procesu výroby. K propagaci dochází v bioreaktorech, kde je cílem pomnožit kulturu a co nejvíce jí adaptovat na substrát, který bude zkvašovat včetně podmínek budoucího kvašení. Fermentory, tak mají regulovatelný přístup vzduchu, regulaci tlaku, teploty atd. Výhodou kultur pivovarských kvasinek je, že může docházet k jejich opětovnému použití na další várky po jejich odebrání na konci hlavního kvašení a jejich úpravě.

Pivovar tak nemusí množit velký objem ve svém bioreaktoru, ale s každou další várkou získává nový podíl biomasy kvasinek, který se může několikrát využít. Kvasinky spodního kvašení jsou v některých pivovarech znovu inokulovány do dalších várek dvakrát i třikrát. Bylo, ale zaznamenáno, že kvasinky spodního kvašení by mohly být užity opětovně až dvacetkrát při správné manipulaci a ošetření biomasy (Kordialik-Bogacka & Diowks 2013).

3.4.1.4 Stresové faktory v technologickém procesu výroby

Stresovými faktory by se daly rozumět kultivační podmínky, ve kterých se kvasinka nachází, ale neodpovídají jejímu optimu. Konkrétněji pak lze mluvit o oxidačním stresu, pH, osmotickém tlaku, množství živin v mediu (v pivovarství mladině) atd. Z toho vyplývá, že téměř všechny operace v procesu výroby piva mohou být pro kvasinky stresovými faktory. Dalším a poměrně významným stresovým faktorem je teplotní šok, který vede k změnám v nativní konformaci buněčných struktur kvasinky a aktivaci genu známého, jako „heat shock gens“ (HSPs). Bylo zjištěno, že kvasinky produkují HSPs i při jiném vystavení stresu než pouze v teplotním šoku, základní funkcí HSPs je tedy rychlá a účinná reakce na stresující podmínky kultivace kvasinky.

Mezi další faktory ovlivňující činnost kvasnic pak patří oxidativní forma stresu. Ten je často přisuzován působení aktivních forem kyslíku, jako kyslíkové radikály, reaktivní formy kyslíku např. H_2O_2 . Takové formy kyslíku se produkují během oxidačního metabolismu kvasinek, mohou se v buňce hromadit a ovlivnit jejich činnost a tím i technologický záměr negativním způsobem.

Oxidativní stres je většinou způsoben během aerobní propagace kulturních kvasinek. Teplotní stres kvasinek je vyvolán výkyvy teplot mezi prostředím, ve kterém se nachází kultura a teplotou media, kam je inokulována (mladina). Bylo prokázáno, že teplotní stres u dané populace kvasinek vyvolává vyšší rezistenci k pozdějším tepelným výkyvům, ale i k ethanolovému stresu. Z praxe vyplývá, že teplotní stres netvoří zásadní problém v pivovarské technologii. Bylo však dokázáno, že s rostoucí teplotou prostředí roste nepříznivý vliv ethanolu na kvasinky. Technologicky významný je pak ethanolový stres, a to hlavně u tzv. HGB technologie (High Gravity Brewing). Vyšší koncentrace ethanolu v prostředí zvyšuje u kvasinek permeabilitu cytoplazmatické membrány a inhibuje transport některých živin do buňky. Osmotický stres vyvolán nevyrovnanou koncentrací látek vně a uvnitř buněk se týká hlavně včasných fází kvašení a speciálních typů pív. K inhibici osmotického stresu je doporučováno dodat více stopových prvků do zkvašované mladiny (Novák et al. 2006).

3.4.1.5 Vliv kvasinek na senzorické vlastnosti piva

Organoleptické vlastnosti piva jsou do značné míry ovlivněny užitou kulturou kvasinek včetně podmínek vedení hlavního kvašení a dokvašování (zrání) piva. Vhodně zvolený kmen použitých kvasinek má značný vliv na produkt. Jednotlivé kmeny se liší genetickou informací, což určuje syntézu jednotlivých proteinů, které ve velké míře ovlivňují metabolické dráhy mikroorganismu během fermentace včetně produktů fermentace. Mezi látky jejich produkce během kvašení může být rozdílná v závislosti na zvoleném kmenu, patří i tzv. sensoricky aktivní látky. Jedná se hlavně o vyšší alkoholy, estery, těkavé kyseliny, glycerol, sirmé sloučeniny, vicinální diketony, acetaldehydy a další. Estery jsou schopny ovlivňovat aroma výrobku, a to již ve stopových koncentracích. Pivo pak může ve vůni mít nádech banánů, květin, mýdlovou vůni atd. Aldehydy v menších koncentracích, mohou dodávat pozitivní ovocné aroma ve vyšších množstvích aroma, přechází do pachu po shnilých jablcích. Další velice důležité látky jsou vicinální ketony, mezi které řadíme diacetyl, (butan-2→3-dion), který v pivu tvoří převážně nežádoucí „máslovou“ chuť.

Veškeré zmíněné látky mají vliv na charakter a senzorickou kvalitu výrobku. Během procesu výroby fermentovaných alkoholických výrobků je potřeba dbát na správné podmínky vedení kvašení včetně zamezení vzniku negativních stresových faktorů. Neméně důležité je, ale také zvolení správného kmene kvasinek s požadovanými vlastnostmi (Vontřbová et al. 2017).

3.4.2 Lihovarské kvasinky

Kvasinky se pro výrobu lihu užívají již dlouhou dobu. Jako kvasinky lihovarské se užívají kmeny *Saccharomyces cerevisiae*. Jsou charakteristické poměrně velkou tolerancí ke koncentracím ethanolu a stresovým faktorům (Khan et al. 2017). Dále je pro ně typická vyšší rychlost kvašení, vysoký obsah alkoholu na jednotku metabolizovaného substrátu a nevýznamné množství vedlejších produktů fermentace, jako estery, mastné kyseliny atd. (Krescanková et al. 2015).

Lihovary na našem území mají poměrně dlouhou tradici. Jako suroviny pro výrobu lihu jsou užívány substráty bohaté na škrob a další zkvasitelné sacharidy. Mezi nejvýznamnější suroviny pro výrobu lihu v globálním měřítku pak patří cukernaté a škrobnaté plodiny, jako cukrová třtina, cukrová řepa, čirok, melasa, obilí a havarované ovoce. Cukerné substráty představují stále nejlepší volbu pro výrobu lihu, a to hlavně cukrová třtina a cukrová řepa jsou technologicky nejlépe využitelné z hlediska energetické bilance výroby (Carioca & Leal 2017). V dnešní době jsou však vyvíjeny snahy o produkci lihu a bioethanolu i jinými technologiemi. Jsou nazývány výrobami druhé a třetí generace. Tyto výroby mají velkou výhodu ve využití odpadních surovin a meziproductů zemědělské výroby. Složením se jedná o dřevnaté části plodin obsahující lignin, celulózu, hemicelulózy, odpadní produkty papírenského průmyslu atd. Tento fakt sice snižuje vstupní náklady surovin, ale je zapotřebí následná hydrolýza rostlinného substrátu, aby kvasinky byly schopny metabolizovat daný substrát, což je poměrně nákladný proces (Melendez et al. 2022).

3.4.3 Vinařské kvasinky

Výroba vína, jakožto kvasná technologie patří do klasických biotechnologií. Má též dlouhou historii téměř srovnatelnou s pivem. Technologie výroby vína je odlišná od pивní i lihovarské vstupní surovinou i postupy výroby a je časově náročnější. Vstupní surovinou, která obsahuje cukernou složku, jsou hrozny révy vinné *Vitis vinifera*. V ní je vyšší zastoupení monosacharidů, polyfenolů a jiných látek než v ostatních surovinách kvasného průmyslu. Hlavní fermentační medium vinařského průmyslu je tedy mošt získaný lisováním hroznů révy vinné. Z hlediska chemického složení moštu je to v průměru: 76 % voda, 23 % cukry, 0,4 % anorganické soli, 0,7 % kyselin, 0,01 % fenolické látky, 0,1 % dusíkaté látky, 0,01 % lipidy a 0,02 % aromatické látky (Pavloušek 2006).

Přeměna z hroznů révy, posléze vinného moštu ve víno je zapříčiněna převážně kulturními vinnými kvasinkami *S. cerevisiae*. Další méně obvyklou kvasinkou, která se na procesu fermentace podílí, je *Saccharomyces uvarum*, která je charakteristická svou činností i v nižších teplotách vedené fermentace. Avšak hlavní podíl zkvašeného obsahu stále tvoří *Saccharomyces cerevisiae*, ostatní rody totiž neobstojí v nižší teplotě, vyšším osmotickém tlaku, nižším pH atd. (Csoma et al. 2010).

Zvláštností tohoto odvětví je užívání i spontánního zakvašování moštů, kdy se nativní mikroorganismy vyskytující na povrchu hroznů a podílí se na hlavním kvašení suroviny. Tato metoda začala být na ústupu v druhé polovině šedesátých let, kdy se dostaly do popředí sušené „startovací“ kultury kvasinek a začaly být distribuovány vinařům, kteří je přidávají v začátku hlavního kvašení moštu. Takto řízená fermentace zlepšuje vinaři šanci na stabilizaci finálního výrobku. (van Wyk et al. 2021). Avšak složení spontánních kultur kvasinek se liší rok od roku s každou sklizní a specifickou lokalitou vinice, což dává produktu specifické organoleptické vlastnosti charakteristické pro daný region (Csoma et al. 2010). Spontánní fermentace zahrnuje mnoho druhů kvasinek, které nepochybně zvyšují komplexnost a diverzitu aromatických látek obsažených ve víně. Studie Xu et al. (2020) se zabývala korelací mezi spontánním kvašením a organoleptickými vlastnostmi vína takto vyrobeného. Je to spojeno se zájmem vinařů na produkci vín s výraznými chuťovými vlastnostmi: „plným, kulatým tělem“ vína.

3.4.4 Pekárenské kvasinky

Využití kvasinek v pekárenské technologii patří též ke klasickým kvasným technologiím. V potravinářské praxi se využívá jejich metabolické činnosti k nakynutí těst. Díky jejich produkci CO₂ se do těsta tak dostává plynná fáze, která mění vlastnosti a charakter těsta, přičemž se zvětšuje jeho objem. Přímo spjatým odvětvím s pekárenským průmyslem je produkce droždí. Droždí je nejčastěji částečně nebo úplně sušená, čistá kultura kvasinek *S. cerevisiae* přidávána během technologického procesu do těst. Pekárenské kvasinky (droždí) jsou produkovány v několika formách. Ve formě aktivních prášků lyofilizovaných kultur, peletové či kostkové formě i ve formě tekuté. S nástupem modernějších technologií se izolovaly jednotlivé kmeny i s přičiněním genetických manipulací kvasinek. To má vliv na technologické postupy výroby v mnoha odvětvích kvasného průmyslu, pekárenský nevyjímaje. Samotné droždí má pak vliv na reologické vlastnosti těsta díky snižujícímu se pH, produkci menšího množství alkoholu a mechanickým změnám v textuře, tažnosti a tuhosti těsta pronikáním bublin CO₂ do něj. V neposlední řadě droždí ovlivňuje organoleptické vlastnosti finálních výrobků (Rosentrater & Evers 2018).

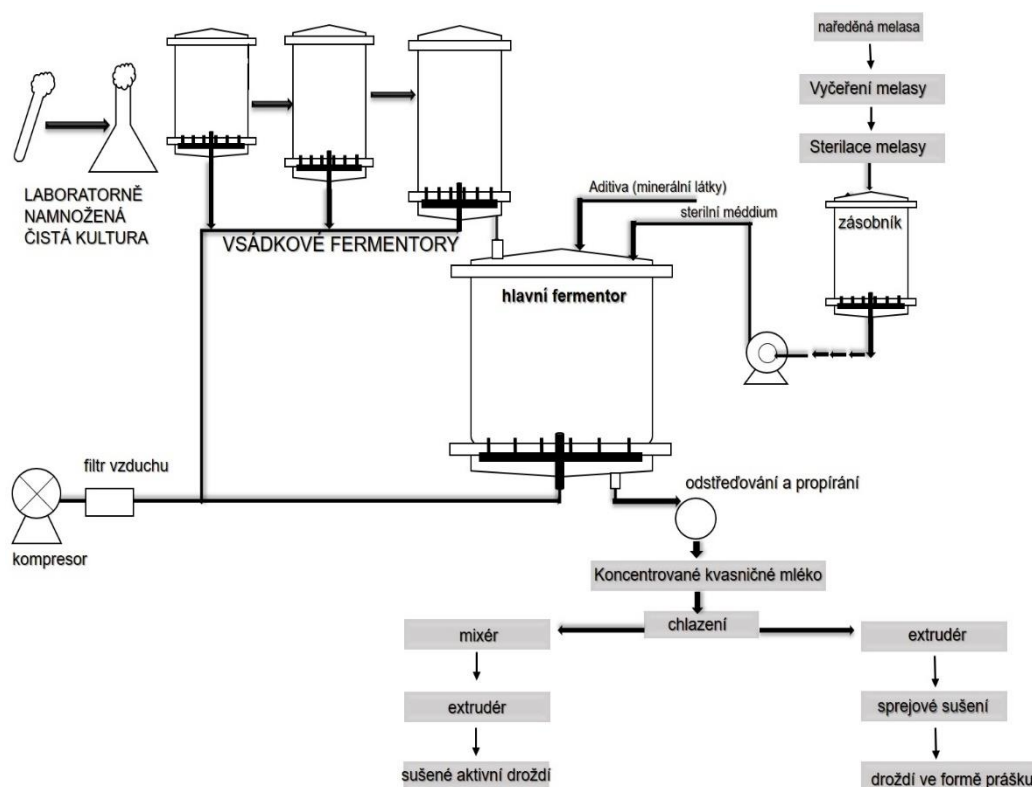
3.4.4.1 Technologie výroby droždí

Produkce *Saccharomyces cerevisiae*, jakožto pekárenské kvasinky je prováděna v tzv. vsádkových kontinuálních reaktorech. Cílem je vytvořit, co největší množství aktivní biomasy kvasinek, která se následně bez jejího většího poškození inaktivuje do latentní fáze. Toho je docíleno postupným sušením namnožené kultury, lyofilizací nebo zchlazením. Samotné vedení a technologický postup propagace pekařských kvasinek je odvislé od dosažení, co nejlepších podmínek kultivace tohoto mikroorganismu a opatrnou manipulací po dosažení požadovaného objemu. To znamená udržet kulturu kvasinek aktivní v jejich optimálních kultivačních podmínkách, ty jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1: Optimální kultivační podmínky *S. cerevisiae*:(Attfield 1997, upraveno)

Kultivační faktor	Optimum
Teplota	25-40 °C
pH	4,5-5,0
Přístup kyslíku	54 kg biomasy aerobně, 7,0 kg anaerobně
Zdroj uhlíku	monosacharidy (melasa, cukrová třtina atd.)
Zdroj dusíku	(NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ Cl, močovina – 2,5 g · l ⁻¹
Minerální látky	P, K, Ca, Na, Mg, S
Generační doba	2,0 – 2,2 h (30 °C)

Technologie výroby droždí (znázorněná na obr. 4) začíná laboratorní izolací vhodné kultury kvasinek. V laboratorních podmínkách se kultura namnoží do objemu několika litrů inokula. Poté se připraví kultivační medium, které bude přitokováno do fermentoru. V praxi je užívána melasa, která je naředěna vodou na požadovanou koncentraci a sterilována před vpravením do fermentačního zařízení. Je upraveno pH vznikajícího kultivačního media na 4,5-5. Medium je doplněno o aditivní složky s minerálními látkami a zdrojem dusíku. Poté dojde k ochlazení media na 30 °C. Posléze se přečerpá inokulační medium s čistou kulturou kvasinek do velkokapacitního cylindrokonečného fermentačního zařízení a započne kultivační proces. Do tanku je přiváděn sterilní vzduch a odčerpáván CO₂. Tank je konstruován s dvouplošňovou technologií ke chlazení media ve fermentoru, aby se mohla regulovat teplota. Celý děj je totiž exotermní. Během množení biomasy je kontinuálně přitokován roztok melasy. Během procesu obvykle dojde k namnožení 24 generací kvasinek. Touto technologií je možno utržit výtěžek až 100 t kvasné biomasy z 0,2 kg inokulované kultury. Následně se odčerpá vzniklá biomasa na odstředivky, kde se oddělí přebytečná voda. Poté dochází k úpravě droždí do finální podoby sušením či formováním. Následuje balení, skladování poté expedice výrobku. Celý tento proces probíhá za přísných hygienických podmínek, aby nedocházelo ke kontaminaci finálního výrobku, to zahrnuje pravidelnou sanitaci technologie i prostor výroby včetně skladovacích prostor (Joseph & Bachhawat 2014).



Obr. 4: Schéma velkokapacitní výroby droždí (Joseph & Bachhawat 2014, upraveno)

3.4.5 Produkce proteinu

Produkce mikrobiální biomasy kvasinek bohatých na bílkoviny je v dnešní době velmi diskutované téma. Díky enzymatické činnosti kvasinek *S. cerevisiae* a pokročilým metodám genetického inženýrství se daří nacházet uplatnění kvasinek i v dalších odvětvích než jen v klasických biotechnologiích. Jednou z možností využití je právě produkce SCP (single cell protein). Uplatnění by bílkoviny získané z kvasinek ve formě biomasy mohly získat například v krmivářství, ale do budoucna určitě i v lidské výživě. Produkce kvasničného proteinu spočívá v získání co největšího objemu biomasy kvasné kultury a její následné úpravě. Jelikož by měl mít SCP do budoucna kompetitivní charakter na trhu mezi ostatními výrobky bohatými na bílkoviny, tak musí být technologie výroby, co nejefektivnější, protože kvalitou a organoleptickými vlastnostmi se stále nevyrovnává konvenčně získávaným zdrojům bílkovin. Nejnákladnější položkou je při produkci SCP kulturační medium pro kvasinky, a proto jsou vyvíjeny snahy o využití odpadních surovin nebo meziproductů ostatních potravinářských výrob. Používá se melasa, suroviny bohaté na polysacharidy a jiné cukerné složky. Proces výroby SCP se člení do několika kroků a probíhá většinou v kontinuálních bioreaktorech.

Výroba začíná přípravou a stabilizací substrátu pro fermentaci, sterilací vstupních surovin kultivačního media, přidáním aditiv, inokulace media kvasnou kulturou, samotná fermentace, při níž dojde k znásobení objemu biomasy kvasinek. Následuje odstředění přebytečné vody, narušení buněčných struktur kvasinek biomasy, sprejové sušení, balení a distribuce. Pro správné vedení kontinuálního množení kvasinek je také nutné splnit všechny nároky kvasinek na zdroje makrobiogenních látek i stopových prvků. Proto se do bioreaktorů na počátku fermentačního procesu dodává také zdroj dusíku (amoniak nebo močovina), fosforečné soli a další makroelementární prvky (K, S, Mg, Ca atd.). V bioreaktoru je vedena fermentace (aerobní respirace), při níž se cíleně upravuje pH, tlak, množství kyslíku a CO₂. Všechny tyto faktory mají totiž vliv na množství vyprodukované biomasy kvasinek a množství získaného SCP (García-Garibay et al. 2014).

3.5 Chemický průmysl

Biotechnologie jsou velmi všestranný a flexibilní obor z hlediska využitelnosti v procesní praxi. Proto jsou považovány za klíč k udržitelnému chemickému průmyslu v budoucnu. Biotechnologie díky využití širokého spektra mikroorganismů nabízí zcela nové příležitosti produkce nám již známých či nových produktů. Jejich největší výhodou jsou nižší teploty vedení biosyntéz a menší znečištění prostředí oproti konvenčně využívaným technologiím v chemickém průmyslu (Gavrilescu & Chisti 2005). Kvasinky jsou celosvětově hlavním výrobcem biotechnologických produktů, převyšující kapacitu a ekonomické výnosy jakékoli jiné skupiny průmyslových mikroorganismů. Jen samotná roční světová produkce *Saccharomyces cerevisiae* je více než 1 milion tun, což je úroveň, která převyšuje kombinovanou produkci jiných průmyslových mikroorganismů asi o dva řády (Hui et al. 2004).

Kvasinky jako nejrozšířenější výrobní prostředek biotechnologií, nalezly uplatnění například při výrobě kyselin, biopaliv jako jsou například bioetanol nebo isobutanol, ale také při produkci farmakologických přípravků a léčiv. Kvasinky jsou využívány jak k produkci různých látek, tak odstranění polutantů. Příklady využití kvasinek jsou uvedeny v tabulce 2. Kvasinky se využívají jak v potravinářském průmyslu, tak v produkci chemických látek, kde v posledních desetiletích nacházejí své další uplatnění.

Tab 2.: Příklady kvasinek využívaných v biotechnologii (Johnson & Echavarri-Erasun 2011)

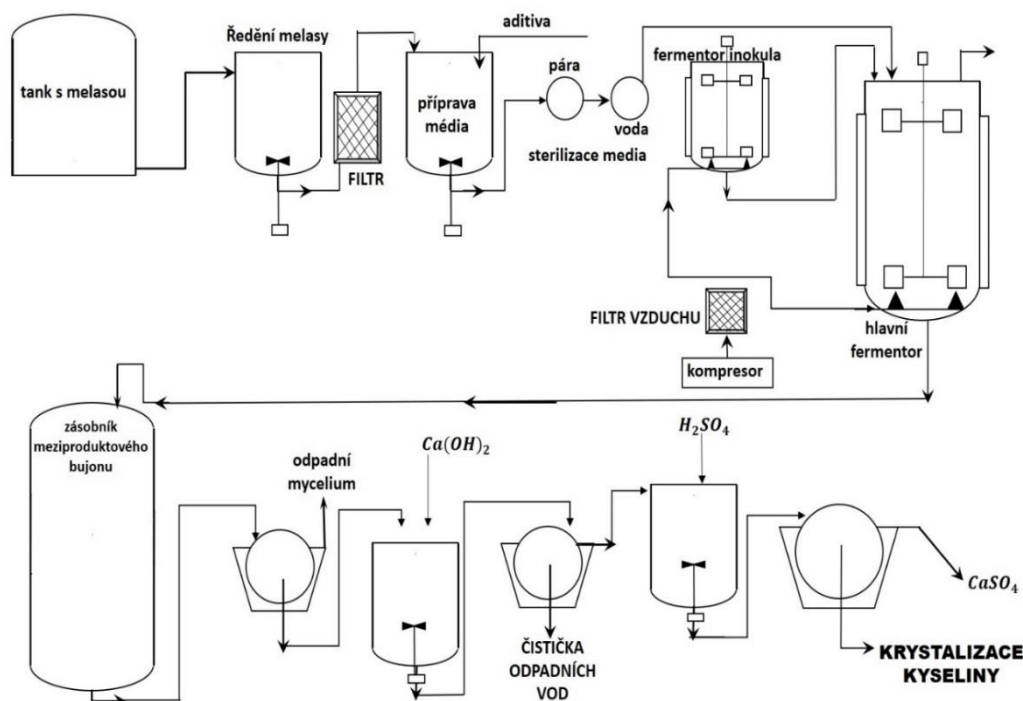
Kvasinky (rod a druh popř. pouze rod)	Příklady produktů a využití	Literatura
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Produkce bioetanolu a další biopaliv. Produkce organických kyselin.	Monir <i>et al.</i> 2020
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Produkcí heterologních proteinů	Giga-Hama & Kumagai 1998
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Produkce jednobuněčného proteinu, exopolysacharidů a čistých chemikálií	Antoni <i>et al.</i> 2007, Johnson & Echavarri-Erasun 2011
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Produkce jednobuněčného proteinu, exopolysacharidů a čistých chemikálií	Antoni <i>et al.</i> 2007, Johnson & Echavarri-Erasun 2011
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Produkcí hydrolytických enzymů	Wang <i>et al.</i> 1999, Johnson & Echavarri-Erasun 2011
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Produkce lipolytických enzymů a organických kyselin	de García <i>et al.</i> 2007
<i>Blastobotrys adenivorans</i>	Produkce hydrolytických enzymů a produkce heterologních proteinů	Böer <i>et al.</i> 2005, Johnson & Echavarri-Erasun 2011
<i>Saccharomycopsis</i> spp.	Produkce bioetanolu a kyseliny L-mléčné.	Hahn-Hägerdal <i>et al.</i> 2007
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Produkce lipidů, karotenoidů a bionafty	Fickers <i>et al.</i> 2005, Dai <i>et al.</i> 2007
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Produkce astaxanthinu	Lukács <i>et al.</i> 2006
<i>Candida</i> spp.	Využití jako biokatalyzátory, produkce jednobuněčného proteinu (SCP), dikarboxylových kyselin	Faber, 2004, Johnson & Echavarri-Erasun 2011
<i>Trichosporon</i> spp.	Metabolizace polutantů a xenobiotik v procesech biorerediace	Bergauer <i>et al.</i> 2005

3.5.1 Produkce kyselin

Celá řada kvasinek našla využití při produkci různých druhů organických kyselin. Jako příklady, které se již uplatnily i v průmyslovém měřítku, mohou sloužit produkce kyseliny mléčné nebo kyseliny citronové. K průmyslové produkci kyseliny mléčné se používá několik druhů kvasinek jako například *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* a *Pichia stipitis*. Právě dostupnost kyseliny mléčné z kvasinek a dalších mikroorganismů vedla k rozšířenému použití, jako například její polymerace na kyselinu polymléčnou. Kyselina polymléčná a příbuzné polymery se vyvíjejí pro různé produkty včetně biologicky odbouratelných plastů a textilních vláken (Ilmén et al. 2007).

Jednou z nejvíce mikrobiálně produkovaných organických kyselin je kyselina citronová. Jedná se o velmi důležitou surovinou farmacie, potravinářství, ale i dalších odvětví. Je hojně užívána pro minimální toxicitu, jako okyselovadlo, ale i antioxidantním účinkům, jako aditivní složka potravin.

Celková spotřeba citronové kyseliny průmyslovými odvětvími činí 75 % v potravinářství, kolem 10 % farmacie a zbylých 15 % zahrnují ostatní průmyslová odvětví. K její produkci jsou používány kromě plísní *Aspergillus niger* také kvasinky, a to *Candida lipolytica*, *Saccharomyces lipolytica* či *Yarrowia lipolytica* (Ma et al. 2020). Během procesu výroby kyseliny citronové dochází k látkové přeměně cukerné složky, jako zdroje uhlíku aerobní respirací až na acetyl-CoA a oxalacetát, a tyto dva metabolity následně přechází až na kyselinu citronovou (Vandenberghe et al. 2017).



Obr. 5: Schéma výroby kyseliny citronové (Goldberg & Rokem 2017, upraveno)

Mezi další organické kyseliny, které jsou produkovány mikrobiálně, patří kyselina mléčná. Kyselina, 2-hydroxypropanová je dodávána do potravinářského, farmaceutického i chemického průmyslu. K její produkci slouží ve větší míře kulturní bakterie mléčného kvašení, ale také již některé druhy kvasinek, jejichž výhodou je produkce mléčné kyseliny z levnějších substrátů a nižší požadavky na pH během vedení fermentace, než u bakterií. To snižuje celkovou nákladovost výroby. Rody *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* a *Candida* s modifikovanou expresí genu laktátdehydrogenázy (ldh) jsou schopny produkovat kyselinu mléčnou ze substrátů, jako hydrolyzovaný kukuřičný škrob nebo melasa (Karaffa & Kubicek 2021).

V posledních letech vzrůstá zájem na průmyslovém využívání nekonvenčních kmenů kvasinek. To je spjato s jejich odolností k vnějším vlivům, jako je teplota nebo pH, a díky jejich specifické metabolické činnosti, které je dosahováno bioinženýrstvím. Jednou z těchto neobvyklých kvasinek je například *Meyerozyma guillier-mondii*. Je to askomycotní kvasinka (anamorf – *Candida guilliermondii*), která disponuje širokým polem substrátů, na kterých se může kultivovat, specifickou fyziologií a množstvím látek, které je schopna syntetizovat. Mezi produkty jejího metabolismu na specifickém substrátu patří dále také organické kyseliny. Je schopna produkce organických kyselin, jako indol-3-oxalová, 3-hydroxypropionová či citronová kyselina. To jsou velmi důležité látky s poměrně velkým spektrem využití v potravinářství, farmacii i chemickém průmyslu (Yan et al. 2021).

3.5.2 Produkce bioethanolu

V dnešní době již panuje všeobecný názor, že fosilní paliva patří k neobnovitelným zdrojům energie, jejich zdroj je omezený a vyčerpatelný. Nehledě na skutečnost, že s největší pravděpodobností jejich spalováním dochází k produkci skleníkových plynů a tím poškození atmosféry (Anbarasan et al. 2018). Nedávné studie a výzkum alternativních zdrojů energie byly tedy zaměřeny na zvýšení účinnosti a výtěžku při získávání nejnámější alternativy k fosilním palivům, tedy bioethanolu. Mezi největší výhody užití bioethanolu je jeho vysoké oktanové číslo, které může snižovat množství emisí CO₂, CO a dalších produktů spalování do atmosféry (Tesfaw et al. 2021). Konvenční způsob získávání bioethanolu je založeno na mikrobiální fermentaci odpadních surovin zemědělství a potravinářského průmyslu. Jedná se převážně o melasu, která má vhodné zastoupení zdrojů uhlíku ve formě vyššího množství zkvasitelných cukrů (sacharóza: 32 %, fruktóza: 16 %, glukóza: 14 %), (Mohd Azhar et al. 2017).

Nejběžnějšími mikroorganismy, které zajišťují látkovou přeměnu cukrů na bioethanol jsou zejména jednotlivé kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které rostou nejlépe na hexózových cukrech (Jayus et al. 2016). Mezi další kvasinky, které se používají k výrobě bioethanolu, zejména pentózové cukry patří *Pichia stipitis*, *Pichia tannophilus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces maxianus* a *Candida humilis* (Thatoi et al. 2014).

Proces výroby bioethanolu závisí na mnoha faktorech, jako jsou například složení suroviny, koncentrace cukrů, teplota, pH prostředí, doba fermentace, rychlosti míchání a množství inokula.

Obecně existují tři hlavní technologické kroky při výrobě ethanolu:

1. Příprava surovin a získání roztoku inokula, který obsahuje zkvasitelné cukry.
2. Přeměna cukrů na ethanol - fermentace.
3. Separace a čištění bioethanolu.

Suroviny, jako jsou například obiloviny, hliznaté plodiny nebo lignocelulózová biomasa, jejichž zdrojem jsou zemědělské a dřevní odpady, musí být obvykle předupraveny a hydrolyzována na fermentovatelné cukry.

Předúprava má významný vliv na celkový proces, který usnadňuje hydrolyzu a slouží k produkci vyššího množství zkvasitelných cukrů. Ovlivňuje množství výtěžku ethanolu a výrobní náklady (Wang et al. 2009). Metody, které se v současnosti pro předúpravy používají, jsou fyzikální, chemické, biologické a fyzikálně chemické. Fyzikální předúprava nejčastěji využívá mechanické podrcení substrátu. Chemická předúprava zahrnuje například kyselou hydrolyzu nebo alkalickou hydrolyzu (Mohd Azhar et al. 2017).

Při fermentaci mají hlavní úlohu kvasinky, které fermentují cukry na ethanol. Kvasinky během fermentace cukru čelí nepříznivým podmínkám, jako jsou zvýšení teploty (35–45 °C) a zvýšení koncentrace ethanolu (přes 20 %). Rychlost růstu kvasinek a metabolismus rostou se zvyšující se teplotou, dokud nedosáhnou optimální hodnoty. Zvýšení koncentrace ethanolu během fermentace může způsobit inhibici růstu a životaschopnosti mikroorganismů. K odstranění těchto problémů se dnes využívá několik možností. První možností je využití termotolerantních kvasinek, které šetří náklady na chlazení a celulózu. Příkladem může být *Kluveromyces marxianus* je termotolerantní kvasinka, která je schopna kofermentovat jak hexózoový, tak pentózoový cukr a dokáže přežít teplotu 42–45 °C (Cot et al. 2007).

Druhou možností je využití geneticky upravených kvasinek nebo kokultivace dvou kvasinkových kmenů. Hybridní kmeny kvasinek se poté používají současně k fermentaci pentózoových a hexózoových cukrů na ethanol. Hybridní kmen byl vyvinut například fúzí protoplastů *Saccharomyces cerevisiae* a kvasinek fermentujících xylózu, jako je *Pichia tannophilus*, *Candida shehatae* a *Pichia stipitis* (Tanimura et al. 2012). Naproti tomu kokultivační proces současně kultivuje a pěstuje dvě různé kvasinky ve stejném reaktoru. Společná kultura poté vykazuje lepší produkci ethanolu ve srovnání s čistou kulturou. V kokultivaci se využívající kvasinky jako *Pichia fermentans* a *Pichia stipitis*, které jsou kombinovány se *Saccharomyces cerevisiae*, takže jsou během fermentace efektivně využívány jak hexózoové a pentózoové cukry. K následnému čištění bioethanolu před jeho použitím jako paliva se používají zejména separační technologie, jako je například destilace nebo rektifikace (Behera et al. 2010).

3.5.3 Produkce isobuthanolu

Hlavní nevýhodou bioethanolu jako alternativního zdroje energie je ve srovnání s běžně využívanými fosilními palivy nižší energetická hustota. Ta je definována jako množství energie uvolněné na jednotku hmotnosti nebo objemu. Hlavně z tohoto důvodu je snahou pomocí biotechnologií produkovat alkoholy s vyšším obsahem uhlíku (např. C3–C5), jako je například isobuthanol (Fu et al. 2021). Dalšími výhodami isobuthanolu ve srovnání s ethanolem je nižší obsah kyslíku, vysoké oktanové číslo a nižší hygroskopičnost a těkavost, což z isobuthanolu činí ideální přísadu nebo alternativu benzínu.

Díky těmto vlastnostem je isobuthanol produkován fermentačními procesy biopalivem druhé generace s řadou aplikací, které řeší problém způsobený bioethanolem. Na rozdíl od ethanolu je isobuthanol méně rozpustný ve vodě a nezpůsobuje korozi potrubí (Wess et al. 2019). Poměr míšení isobuthanolu je také vyšší ve srovnání s ethanolem. V současné době se isobuthanol vyrábí hlavně chemickou syntézou. Proces chemické syntézy isobuthanolu ale vyžaduje vysokou spotřebu energie a stále se spoléhá na fosilní paliva. Za vhodnou alternativu je považováno využití celulózy, řas a dalších zdrojů biomasy. Fermentace biomasy k produkci bio-isobuthanolu je tedy považována za velmi důležitý směr vývoje, který by mohl zajistit odklon od fosilních paliv (Yang et al. 2020). Pro produkci bio-isobuthanolu jsou nejčastěji využívány kvasinky kmenů *Saccharomyces cerevisiae* s cytosolicky lokalizovanou isobuthanolovou cestou nebo kvasinky *Pichia pastoris* a *Candida glabrata*. Problémem většího využití fermentace pomocí kvasinek zůstává to, že produkce přirozeného isobuthanolu kvasinkami je nízká (<15 % teoretického maximálního výtěžku 410 mg/g), takže bude zapotřebí značného úsilí, aby se isobuthanol stal primárním fermentačním produktem (Patra et al. 2021).

3.6 Farmacie

Široké uplatnění našly kvasinky také ve farmaceutickém průmyslu. Příklady využití kvasinek v tomto odvětví jsou popsány na obrázku 5. Kvasinky mohou například podporovat zdraví lidí i zvířat, zvýšit biologickou dostupnost minerálů hydrolýzou fytátu, biofortifikací folátu, jsou schopny detoxikace toxinů a xenobiotik. Navíc odolné druhy kvasinek vykazovaly schopnost přežití v podmínkách trávicího ústrojí, jsou také rezistentní k antibiotikům, což z nich činí pravděpodobné kandidáty na probiotika.



Obr. 6: Možnosti využití kvasinek ve farmaceutickém průmyslu (Shruthi et al. 2022, upraveno)

Bioterapeutické aplikace jsou u kvasinek popsány díky imunomodulačním účinkům, produkci protilátek, popřípadě možnosti odstranění cholesterolu. Tyto vlastnosti mají kvasinky díky produkci exopolysacharidů (EPS). Exopolysacharidy (EPS) jsou polymery s vysokou molekulovou hmotností vylučované mikroorganismy, které mohou být použity jako bioadheziva, bioflokulanty, biosorbenty, želírovací látky, stabilizátory a zahušťovadla (Riaz Rajoka et al. 2018).

EPS polymery jsou zkoumány především z pohledu biologických a technologických funkčních aktivit, jako jsou flokulace, emulgace, rozpustnost, ale i z pohledu antioxidačních, antibakteriálních a protinádorových aktivit. Exopolysacharidy mají potenciál nejen v potravinářském, ale i biomedicínském a farmaceutickém průmyslu. Tyto látky mají schopnost působit i jako biosurfaktant nebo mohou snižovat hladiny cholesterolu. Vysoké koncentrace cholesterolu v krevním séru je vnímána jako hlavní faktor způsobující kardiovaskulární onemocnění.

Nadměrné množství cholesterolu v séru může vést k různým srdečním onemocněním a také vede k rakovině tlustého střeva. Bylo zjištěno, že kmeny kvasinek *Lipomyces starkeyi* eliminují cholesterol, při čemž vykazovaly procento odstranění cholesterolu až z 90 %. Z kvasinek produkují EPS i další kmeny například *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula* a *Sporobolomyces* (Ragavan & Das 2019). V neposlední řadě byla prokázána antikarcinogenní a protirakovinná aktivita ve studii kmene *Kluyveromyces marxianus* (Saber et al. 2017).

Většina kvasinek má také významnou antimikrobiální aktivitu, která se projevuje tak, že svým působením usmrcují patogenní bakterie pomocí nepřímého způsobu účinku, jako je autoagregace, co-agregace a adhezní schopnost. Tyto schopnosti mají díky β -glukanům. β -glukany jsou přirozeně se vyskytující (1 \rightarrow 3)- β -d-vázané polymery glukózy, které se vyskytují v buněčných stěnách některých kvasinek (Rusinova-Videva et al. 2014). Antimikrobiální aktivitu mají kvasinky také díky produkci látek, jako jsou organické kyseliny, polyaminy, proteázy, mykociny, všechny tyto látky působí také jako antimikrobiální sloučeniny, které ničí patogenní bakterie (Simões et al. 2021).

Kvasinky izolované z ovoce se staly zajímavým zdrojem kmenů s biokontrolou proti plísním, což je cenné a užitečné zejména v potravinářském a krmivářském průmyslu. Produkty na bázi kvasinek a kvasinky v kombinaci s různými druhy bakterií *Lactobacillus* jsou popsány jako prostředky biologické kontroly proti mykotoxinům. Antifugální aktivita byla popsána u kmenů kvasinek *Pichia anomala*, *Kluyveromyces marxianus* nebo *Debaryomyces hansenii* (Fernández-Pacheco et al. 2021).

V posledních letech jsou kvasinky zkoumány i jako probiotika, a to také díky tomu, že kvasinky jsou vysoce tolerantní vůči gastrointestinálním enzymům. Tolerují, také změny pH a prostředí žlučových solí a také organické kyseliny a mohou vydržet být aktivní i při různých teplotách. Jako probiotika jsou označovány životaschopné mikroorganismy, které mají při konzumaci pozitivní vliv na zdraví spotřebitele. Mezi široce uznávaná probiotika patří zejména bakterie mléčného kvašení. Do skupiny probiotických mikroorganismů se postupně přiřazují také některé druhy kvasinek. První kmen, který byl studován a zkoumán pro použití jako probiotika v humánní medicíně, je *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* a tento kmen se používá k prevenci a léčbě průjmů souvisejících s *Clostridium difficile*, proti dalším průjmovým onemocněním, syndromům dráždivého tračníku a infekcím *Helicobacter pylori* a také s průjmy souvisejícími s užíváním antibiotik (Shruthi et al. 2022).

Kvasinka *Saccharomyces boulardii* je doposud jediným probiotikem z kvasinek, u kterého byla prokázána účinnost na základě klinických studií. *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* pomáhá obnovit střevní mikrobiom u pacientů po antibiotické léčbě nebo chirurgickém zákroku a může dočasně fungovat jako náhrada přirozeného mikrobiomu, dokud nebude znovu vytvořen. Z těchto důvodů je velký zájem využít *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* jako složku funkčních potravin nebo doplňků stravy. Podle Mezinárodní rady pro informace o potravinách (IFIC) jsou funkční potraviny: „Potraviny nebo dietní složky, které mohou poskytnout zdravotní přínos nad rámec základní výživy.“ Probiotika svými vlastnostmi příznivě ovlivňují různé fyziologické funkce, což umožňuje jejich zařazení mezi funkční potraviny (Czerucka et al. 2007).

Pokyny pro nejúčinnější použití *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* při léčbě onemocnění jsou různé dle druhu onemocnění, obecně je doporučována denní dávka obvykle vyšší než 10^9 /den. Délka léčby se může pohybovat od 7 dnů do 6 měsíců a probiotikum může být podáváno samostatně nebo jako doplňková léčba, v závislosti na indikaci onemocnění (McFarland2010).

I další kvasinky mají potencionálně probiotickou aktivitu, je ale třeba další výzkum, protože informace o jejich vlivu na zdraví konzumenta jsou zatím málo prozkoumány. Tyto kvasinky (z rodů *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Torulasporea*, *Metchnikowia* aj.), které jsou izolovány z potravních i nepotravnářských biotopů, jsou dnes předmětem intenzivních studií a je reálná šance je také využít, jako doplňky stravy nebo při výrobě funkčních potravin. A to nejen pro fermentační procesy, ale také pro suplementaci, jako cenné živiny s přínosem pro zdraví (Shruthi et al. 2022).

4 Závěr

Zapojení a význam kvasinek v tradiční výrobě fermentovaných potravin je nepřekonatelné v porovnání s jinými skupinami mikroorganismů (bakterie, plísně). Využití kvasinek v biotechnologických procesech se v důsledku řady vlastností a vývoje zrychluje. Jejich využití už několik desetiletí není zaměřeno pouze na zemědělský a potravinářský sektor, ale má i průmyslové využití v dalších průmyslových oblastech lidských činností a také v ekologii. Příkladem může být využití v chemickém a farmaceutickém průmyslu. V jednotlivých popsáných oblastech lze očekávat následující vývoj.

- V rámci potravinářského průmyslu budou vyvíjeny kmeny kvasinek s vyšší výtěžností metabolitů (ethanolu, organických kyselin) s pozitivním vlivem na finální senzorycké a nutriční vlastnosti vyráběných nápojů a potravin.
- Vývoj kvasinkových kultur, které budou produkovat bílkoviny, které budou sloužit jako alternativa k energeticky náročným živočišným zdrojům bílkovin.
- V oblasti zemědělství a ekologie, mohou být kvasinky také použity k odstranění škodlivých a jiných chemických kontaminantů (například pesticidů nebo herbicidů) a znečišťujících látek existujících v ekosystému. Zároveň kvasinky a produkty z nich najdou uplatnění jako přírodní produkty s účinkem proti škůdcům a chorobám kulturních rostlin.
- V rámci chemického průmyslu lze očekávat vývoj biotechnologických procesů, které povedou k rozvoji produkce čistých chemických látek, u kterých nebude třeba využívat náročné energetické procesy pro přečištění a separaci chemických látek.
- Zdokonalení produkce biopaliv první a druhé generace, lze očekávat, že začnou být preferována biopaliva druhé generace, známá také jako pokročilá biopaliva. Ty se budou vyrábět z různých druhů nepotravinářské biomasy. Biomasa se v tomto kontextu rozumí rostlinné materiály a živočišné odpady zemědělské činnosti, potravinářského a dalšího zpracovatelského průmyslu.
- Ve farmaceutickém průmyslu lze očekávat vývoj biotechnologií, které povedou k využití antimikrobiálních, antioxidačních, anti-karcinogenních a probiotických vlastností kvasinek a jejich metabolitů. Po ověření probiotických vlastností kvasinek lze očekávat vývoj funkčních potravin a doplňků stravy s pozitivním vlivem na zdraví konzumenta.

Pokrok ve všech popsáných oblastech, zemědělství, potravinářství, chemickém a farmaceutickém průmyslu a ekologii bude podpořen inovacemi a pokrokem v oblasti genetického inženýrství a v dalších oblastech zabývajících se biotechnologiemi.

5 Literatura

Aguiar A, Milessi TS, Mulinari DR, Lopes MS, da Costa SM, Candido RG. 2021. Sugarcane straw as a potential second-generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. *Biomass and Bioenergy* **144**.

Aguilar-Uscanga B, Francois JM. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology* **37**:268-274.

Alizadeh N, Salimi A. 2021. Multienzymes activity of metals and metal oxide nanomaterials: applications from biotechnology to medicine and environmental engineering. *Journal of Nanobiotechnology* **19**:1-31.

Anbarasan T, Jayanthi S, Ragina Y. 2018. Investigation on Synthesis of Biodiesel from Distillery Spent Wash using Oleaginous Yeast *Metschnikowia Pulcherrima*. *Materials Today: Proceedings* **5**:23293 - 23301.

Antoni, D. Zverlov, V.V. Schwarz W.H. 2007. Biofuels from microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **77**: 23-35.

Aparicio JF, Barreales EG, Payero TD, Vicente CM, de Pedro A, Santos-aberturas J. 2016. Biotechnological production and application of the antibiotic pimaricin: biosynthesis and its regulation. *Applied microbiology and biotechnology* **100**:61-78.

Ariunbaatar J, Bair R, Ozcan O, Ravishankar H, Esposito G. 2021. Performance of AnMBR in Treatment of Post-consumer Food Waste: Effect of Hydraulic Retention Time and Organic Loading Rate on Biogas Production and Membrane Fouling. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**.

Attfield PV. 1997. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology* **15**:1351-1357.

Basso RF, Alcarde AR, Portugal CB. 2016. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations?. *Food Research International* **86**:112-120.

Bergauer P., Fonteyne P.-A. Nolard N., Schinner, F. Margesin R., 2005 Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts *Chemosphere*, **59**: 909-918.

Böer E., Gellissen G., Kunze G. 2005. *Arxula adeninovorans* G. Gellissen (Ed.), *Production of Recombinant Proteins*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 89-110.

Behera S, Kar S, Mohanty RC, Ray RC. 2010. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. *Applied Energy* **87**:96-100.

Carioca JOB, Leal MRLV. 2017. Ethanol Production From Sugar-Based Feedstocks. 24-34in *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier.

Cereghino G. 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology* **10**:422-427.

- Cot MĂˆne, Loret M-O, FranĂşois J, Benbadis L. 2007. Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Research* **7**:22-32.
- Cripa FB, Arantes MK, Sequinel R, Fiorini A, Rosado FR, Alves HJ. 2020. Poultry slaughterhouse anaerobic ponds as a source of inoculum for biohydrogen production. *Journal of bioscience and bioengineering* **129**:77-85.
- Csoma H, Zakany N, Capece A, Romano P, Sipiczki M. 2010. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. *International Journal of Food Microbiology* **140**:239-248.
- Czerucka D, Piche T, Rampal P. 2007. Review article: yeast as probiotics -*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **26**:767-778.
- Duřka F, Trnka J. 2006. *Biochemie v souvislostech*. Karolinum, Praha.
- Dai, C.C. Tao, J. Xie, F. Dai, Y.J Zhao M. 2007. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating activity *Afr. J. Biotechnol*, **6**:2130-2134.
- Eliod3rio KP, Cunha GC de G e, M3ller C, Lucaroni AC, Giudici R, Walker GM, Alves SL, Basso TO. 2019. Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. 61-119 in Elsevier.
- Faber, K, 2004. *Biotransformations in Organic Chemistry. A Textbook (5th edn.)*, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Fickers P. Bennett P.H. Wache Y. Marty A. Mauersberger, S. Smit M.S., Nicaud J.-M. 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res*, **5**:527-543.
- Fern3ndez-Pacheco P, Garc3a-B3jar B, Jim3nez-del Castillo M, Carreño-Dom3nguez J, Briones P3rez A, Ar3valo-Villena M. 2021. Potential probiotic and food protection role of wild yeasts isolated from pistachio fruits (*Pistacia vera*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **101**:2201-2209.
- Fu C, Li Z, Jia C, Zhang W, Zhang Y, Yi C, Xie S. 2021. Recent advances on bio-based isobutanol separation. *Energy Conversion and Management: X* **10**.
- Hahn-H3gerdahl B., Karhummaa K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. Gorwa-Grausland M.F.2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **74**: 937-953.
- Garc3a-Garibay M, G3mez-Ruiz L, Cruz-Guerrero AE, B3rzana E. 2014. Single cell protein | Yeasts and Bacteria. 431-438in *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier.
- de Garc3a V., Brizzio, S. Libkind, D. Buzzini, P. van Broock M., 2007. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina *FEMS Microbiol. Ecol*, **59**: 331-341.
- Gavrilescu M, Chisti Y. 2005. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances* **23**:471-499.

- Gervasi T, Pellizzeri V, Calabrese G, Di Bella G, Cicero N, Dugo G. 2018. Production of single cell protein (SCP) from food and agricultural waste by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Natural Product Research* **32**:648-653.
- Gibson B, Geertman J-MA, Hittinger CT, Krogerus K, Libkind D, Louis EJ, Magalhães F, Sampaio JP. 2017. New yeasts—new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Research* **17**.
- Giga-Hama Y., Kumagai H., 1998. Foreign gene expression in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Springer-Verlag, Berlin
- Goldberg I, Rokem JS. 2017. Organic and Fatty Acid Production, Microbial ☆. 25in Reference Module in Life Sciences. 2017 edition. Elsevier, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel.
- Hui YH, Meunier-Goddik L, Josephsen J, Nip W-K, Stanfield PS. 2004. Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology. CRC Press.
- Iattici F, Catallo M, Solieri L. 2020. Designing New Yeasts for Craft Brewing: When Natural Biodiversity Meets Biotechnology. *Beverages* **6**.
- Ilmén M, Koivuranta K, Ruohonen L, Suominen P, Penttilä M. 2007. Efficient Production of l-Lactic Acid from Xylose by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:117-123.
- Iorizzo M, Coppola F, Letizia F, Testa B, Sorrentino E. 2021. Role of Yeasts in the Brewing Process: Tradition and Innovation. *Processes* **9**.
- Jayus, Nurhayati, Mayzuhroh A, Arindhani S, Caroenchai C. 2016. Studies on Bioethanol Production of Commercial Baker's and Alcohol Yeast under Aerated Culture Using Sugarcane Molasses as the Media. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* **9**:493-499.
- Johnson E. A., Echavarri-Erasun C. 2011. Chapter 3 - Yeast Biotechnology, Editor(s): Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell, Teun Boekhout, *The Yeasts (Fifth Edition)*, Elsevier,
- Karaffa L, Kubicek CP. 2021. Production of Organic Acids by Fungi. 406-419in *Encyclopedia of Mycology*. Elsevier.
- Khan MU, Khan MR, Fazel M, Rashidzadeh S, Shariati MA, Kadmid Y, Elmsellem H, Majeed M. 2017. Design, development and performance evaluation of distillery yeast sludge dryer. *Process Safety* **111**:733-739.
- Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**:185-202.
- Kordialik-Bogacka E, Diowksz A. 2013. Physiological state of reused brewing yeast. *Czech Journal of Food Sciences* **31**:264-269.
- Krescanková K, Kopecká J, Němec M, Matoulková D. 2015. Characterization of Technologically Utilized *Saccharomyces* Yeast. *Kvasny Prumysl* **61**:174-185.
- Legras J-L., Merdinoglu D., Cornuet J-M., Karst F. 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology* **16**:2091-2102.

Letters in applied microbiology. 1993. Blackwell science, Oxford, Oxon.

Liu G, Li S, Shi Q, Li H, Guo J, Ouyang J, Jia X, Zhang L, You S, Qin B. 2021. Engineering of *Saccharomyces pastorianus* old yellow enzyme 1 for the synthesis of pharmacologically active (S)-profen derivatives. *Molecular Catalysis* **507**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468823121001851> (accessed April 16, 2022).

Liu G, Li S, Shi Q, Li H, Guo J, Ouyang J, Jia X, Zhang L, You S, Qin B. 2021. Engineering of *Saccharomyces pastorianus* old yellow enzyme 1 for the synthesis of pharmacologically active (S)-profen derivatives. *Molecular Catalysis* **507**.

Liu Y et al. 2021. Structure, preparation, modification, and bioactivities of β -glucan and mannan from yeast cell wall: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* **173**:445-456

Loo YT, Howell K, Chan M, Zhang P, Ng K. 2020. Modulation of the human gut microbiota by phenolics and phenolic fiber-rich foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **19**:1268-1298.

Lukács, B. Linka, I. Nyilasa I. 2006. Phaffiarhodozyma and Xanthophyllomyces dendrorhous: astaxanthin-producing yeasts of biotechnological importance *Acta Aliment*, **35**: 99-107

Melendez JR, Mátyás B, Hena S, Lowy DA, El Salous A. 2022. Perspectives in the production of bioethanol: A review of sustainable methods, technologies, and bioprocesses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **160**

Mishra R, Minc N, Peter M. 2022. Cells under pressure: how yeast cells respond to mechanical forces. *Trends in Microbiology*.

Monir, MU., Aziz, AA., Yousuf, A, Alam, MdZ. 2020. Hydrogen-rich syngas fermentation for bioethanol production using *Sacharomyces cerevisiea*, *International Journal of Hydrogen Energy*, Volume 45, Issue 36, 18241-18249.

Nandy SK, Srivastava RK. 2018. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. *Microbiological Research* **207**:83-90.

Nielsens O. 2010. Status of the yeast propagation process and some aspects of propagation for re-fermentation. *Cerevisia* **35**:71-74.

Nilsson A, Nielsen J. 2016. Metabolic Trade-offs in Yeast are Caused by F1F0-ATP synthase. *Scientific Reports* **6**.

Novák J, Basařová G, Fiala J, Dostálek P. 2006. Changes to yeast properties in brewing process and fast methods of their monitoring. *Kvasny Prumysl* **52**:3-6.

Novotný P. 2019. Pivařka²: průvodce domácího sládky: teorie, rady, návody, recepty. Jota, V Brně.

Palková Z, Váchová L. 2006. Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiology Reviews* **30**:806-824.

Patra P, Das M, Kundu P, Ghosh A. 2021. Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. *Biotechnology Advances* **47**

- Peña-Gómez N, Ruiz-Rico M, Pérez-Esteve É, Fernández-Segovia I, Barat JM. 2020. Microbial stabilization of craft beer by filtration through silica supports functionalized with essential oil components. *LWT* **117**.
- Pfeiffer T, Morley A. 2014. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences* **1**.
- Ragavan ML, Das N. 2019. Optimization of exopolysaccharide production by probiotic yeast *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 using response surface methodology and its applications. *Annals of Microbiology* **69**:515-530.
- Renneberg R, Berkling V, Loroche V. 2017. Beer, Bread, and Cheese. 1-31 in *Biotechnology for Beginners*. Elsevier.
- Riaz Rajoka MS, Jin M, Haobin Z, Li Q, Shao D, Jiang C, Huang Q, Yang H, Shi J, Hussain N. 2018. Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *LWT* **89**:638-647.
- Rose AH. 1975. Chapter 1 Growth and Handling of Yeasts. 1-16 in *Yeast Cells*. Elsevier.
- Rosentrater KA, Evers AD. 2018. Bread-baking technology. 565-622 in *Kent's Technology of Cereals*. Elsevier.
- Rusinova-Videva S, Pavlova K, Panchev I, Georgieva K, Kuncheva M. 2014. Effect of Different Factors on Biosynthesis of Exopolysaccharide from Antarctic Yeast. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **24**:507-511.
- Saber A, Alipour B, Faghfoori Z, Yari Khosroushahi A. 2017. Secretion metabolites of dairy *Kluyveromyces marxianus* AS41 isolated as probiotic, induces apoptosis in different human cancer cell lines and exhibit anti-pathogenic effects. *Journal of Functional Foods* **34**:408-421.
- Saxena S. 2015. *Applied Microbiology*. Springer India, New Delhi.
- Scoma A. 2017. On the pathways feeding the H₂ production process in nutrient-replete, hypoxic conditions. Commentary on the article "Low oxygen levels contribute to improve photohydrogen production in mixotrophic non-stressed *Chlamydomonas* cultures", by Jurado-Oller et al., *Biotechnology for Biofuels*, published September 7, 2015; 8: 149. *Biotechnology for Biofuels* **10**:1-5.
- Shruthi B, Deepa N, Somashekaraiah R, Adithi G, Divyashree S, Sreenivasa MY. 2022. Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. *Biotechnology Reports* **34**.
- Sicard D, Legras J-L. 2011. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies* **334**:229-236. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1631069110003057>.
- Šilhánková L. 2008. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Academia, Praha.

- Simões LA, Cristina de Souza A, Ferreira I, Melo DS, Lopes LAA, Magnani M, Schwan RF, Dias DR. 2021. Probiotic properties of yeasts isolated from Brazilian fermented table olives. *Journal of Applied Microbiology* **131**:1983-1997.
- Sun J, Sun H, Lv W, Zhang Q, Wan P, Jiang L, Zhong Y. 2021. Quorum sensing mediates yeast cell morphology to improve settleability: Implication for wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **9**.
- Tanimura A, Nakamura T, Watanabe I, Ogawa J, Shima J. 2012. Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. *SpringerPlus* **1**.
- Tesfaw A, Oner ET, Assefa F. 2021. Optimization of ethanol production using newly isolated ethanologenic yeasts. *Biochemistry and Biophysics Reports* **25**.
- Thatoi H, Dash PK, Mohapatra S, Swain MR. 2014. Bioethanol production from tuber crops using fermentation technology: a review. *International Journal of Sustainable Energy* **35**:443-468.
- Tripodi F, Nicastro R, Reghellin V, Coccetti P. 2015. Post-translational modifications on yeast carbon metabolism: Regulatory mechanisms beyond transcriptional control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1850**:620-627.
- Vallesi A, Pucciarelli S, Buonanno F, Fontana A, Mangiagalli M. 2020. Bioactive molecules from protists: Perspectives in biotechnology. *European Journal of Protistology* **75**:N.PAG.
- van Aalst ACA, de Valk SC, van Gulik WM, Jansen MLA, Pronk JT, Mans R. 2022. Pathway engineering strategies for improved product yield in yeast-based industrial ethanol production. *Synthetic and Systems Biotechnology* **7**:554-566.
- van Wyk N, von Wallbrunn C, Swiegers JH, Pretorius IS. 2021. Biotechnology of Wine Yeasts. 428-446 in *Encyclopedia of Mycology*. Elsevier.
- Vandenberghe LPS, Rodrigues C, de Carvalho JC, Medeiros ABP, Socol CR. 2017. Production and Application of Citric Acid. 557-575 in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier.
- Vodrážka Z. 1992. *Biochemie II: Živý systém jako chemický stroj*. Academia, Praha.
- Vontrobová E, Kopecká J, Rotková G, Matoulková D. 2017. Factors Influencing the Production of Sensory Active Substances in Brewer's and Wine Yeast. *Kvasny Prumysl* **63**:173-189.
- Wang GS, Pan XJ, Zhu JY, Gleisner R, Rockwood D. 2009. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods. *Biotechnology Progress* **25**:1086-1093.
- Wang T.T., Lee C.F., Lee B.H. 1999. The molecular biology of *Schwanniomyces occidentalis* Klöcker. *Crit. Rev. Biotechnol*, **19**, 113-143.
- Wess J, Brinek M, Boles E. 2019. Improving isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by successively blocking competing metabolic pathways as well as ethanol and glycerol formation. *Biotechnology for Biofuels* **12**.
- Winter G, Krömer JO. 2013. Fluxomics - connecting 'omics analysis and phenotypes. *Environmental Microbiology* **15**:1901-1916.

Xu W, Liu B, Wang C, Kong X. 2020. Organic cultivation of grape affects yeast succession and wine sensory quality during spontaneous fermentation. *LWT* **120**.

Yan W, Gao H, Qian X, Jiang Y, Zhou J, Dong W, Xin F, Zhang W, Jiang M. 2021. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *Biotechnology Advances* **46**.

Yang J, Kim JK, Ahn J-O, Song Y-H, Shin C-S, Park Y-C, Kim KH. 2020. Isobutanol production from empty fruit bunches. *Renewable Energy* **157**:1124-1130.

Yuan H-wei, Tan L, Kida K, Morimura S, Sun Z-yong, Tang Y-qin. 2021. Potential for reduced water consumption in biorefining of lignocellulosic biomass to bioethanol and biogas. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **131**:461-468.

Zarnkow M. 2014. Beer. 209-215in *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier.

Zhao Y, Damgaard A, Liu S, Chang H, Christensen TH. 2020. Bioethanol from corn stover – Integrated environmental impacts of alternative biotechnologies. *Resources, Conservation* **155**.